



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDOS SOBRE PARASITISMO GASTROINTESTINAL E PULMONAR EM JAVALIS E
VEADOS CAÇADOS EM MONTARIAS DO CENTRO E SUL DE PORTUGAL
CONTINENTAL

SARA MARIA DE SOUSA BERNARDINO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas
Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles
Doutor Nuno Gonçalo Carvalho Caroço dos
Santos

ORIENTADOR

Doutor Nuno Gonçalo Carvalho Caroço dos
Santos

CO-ORIENTADOR

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

2017

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDOS SOBRE PARASITISMO GASTROINTESTINAL E PULMONAR EM JAVALIS E
VEADOS CAÇADOS EM MONTARIAS DO CENTRO E SUL DE PORTUGAL
CONTINENTAL

SARA MARIA DE SOUSA BERNARDINO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas
Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles
Doutor Nuno Gonçalo Carvalho Caroço dos
Santos

ORIENTADOR

Doutor Nuno Gonçalo Carvalho Caroço dos
Santos

CO-ORIENTADOR

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

2017

LISBOA

Agradecimentos

Em primeiro lugar, os meus sinceros agradecimentos ao Doutor Nuno Santos, investigador no Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos (CIBIO) da Universidade do Porto, por me aceitar como sua orientanda neste projeto de mestrado, permitindo que pudesse trabalhar e contactar com a realidade de campo das doenças infecciosas e parasitárias silvestres e mostrar o lado da caça maior, que eu desconhecia. Agradeço também por partilhar o gosto pela vida animal selvagem, por toda a sua simpatia e disponibilidade demonstradas durante todo o período em que decorreu o nosso trabalho.

Ao Professor Doutor Luís Madeira de Carvalho do Sector de Parasitologia e Doenças Parasitárias da FMV-ULisboa, por me co-orientar ao longo deste caminho, pelos seus ensinamentos demonstrados, que me enriqueceram bastante. Também, pelo seu sentido de humor, bom gosto pela música e boa disposição, condições necessárias para ajudar a atingir a conclusão deste trabalho.

Agradeço também, à Dra. Lídia Gomes, pelo apoio prestado no laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da FMV-UL, facultando os seus conhecimentos e as suas técnicas de trabalho. Também pela partilha da sua paixão por séries televisivas, dando-me a conhecer a melhor série de sempre, e pelo seu gosto musical.

Aos meus colegas de Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias, o meu muito obrigada por toda ajuda prestada e companheirismo, nomeadamente, à Ana Ferreira pela amizade de há muitos anos, à Ana Valente pelos seus conselhos, ao David Ramilo que todos os dias me fazia arrancar um sorriso.

Pela colaboração do sector de Anatomia Patológica da FMV-UL, nomeadamente à Professora Doutora Maria da Conceição Peleteiro e ao Sr. Bruno, por me terem disponibilizado o espaço, de forma a poder analisar algumas das minhas amostras, importantes neste trabalho.

A todos os caçadores, reservas de caça e empresas cinegéticas que proporcionaram a possibilidade de realização deste trabalho, em particular ao facultarem o acesso a montarias e respectivos animais abatidos, permitindo a logística necessárias para a colheita das amostras biológicas indispensáveis para a sua execução. Um especial agradecimento aos responsáveis da “Companhia das Lezírias, S.A.”, da Associação de Caçadores “Alfama” do concelho de Serpa e ainda do Departamento de Conservação da Natureza e Florestas do Alentejo, ao permitirem os nossos trabalhos de campo.

O nosso agradecimento vai também para a Professora Doutora Margarida Correia-Neves da Escola de Ciências da Saúde, Instituto de Investigação em Ciências da Vida e da Saúde (ICVS) da Universidade do Minho, assim como para os responsáveis do Laboratório de Biosegurança de Nível 3 desta instituição, por permitirem o nosso acesso e trabalho na referida estrutura laboratorial.

Ao Professor Telmo Nunes da FMV-ULisboa, muito obrigada pela sua ajuda e paciência no tratamento e análise dos dados estatísticos, pelos seus conselhos e pelo apoio dos seus alunos de epidemiologia ao me ajudarem a concretizar o mapa coroplético, que tanto trabalho me deu e que não conseguiria concluí-lo sozinha.

Pela minha grande amiga e colega Filipa Cortez, que esteve sempre ao meu lado nesta longa caminhada que é o curso de Medicina Veterinária. Por ter sido minha conselheira e pelos nossos momentos de boa diversão e de partilha.

Às minha amigas de sempre, especialmente Diana Bértolo, que desde a nossa tenra idade esteve sempre presente, pelo seu sentido de humor, conselhos preciosos e companheirismo.

À minha família nuclear, por serem a minha base na vida. À minha irmã mais nova Joana, que desde pequena lhe transmito o gosto pelos animais e natureza e gosto musical e dança, agradeço pelo todo apoio incondicional e conselhos e carinho. À minha irmã Inês, que apesar de ser 15 meses mais nova, é como uma irmã mais velha, pelo seu carácter, persistência, irmandade, gratidão e por acreditar sempre em mim, estou-lhe infinitamente grata. À minha mãe que me incutiu o gosto e saber pela natureza, pelos seus ensinamentos ao longo da minha vida escolar e pelo crescimento como pessoa. Ao meu pai, que ao longo desta caminhada esteve longo da vista, mas sempre muito perto do coração e que mesmo ausente está sempre presente na minha vida profissional e pessoal.

A todos os meus animais que tive, porque sem eles o gosto nesta área não teria sido possível e um especial à minha cadela Maggie que partiu muito recentemente e que com ela aprendi o que é ser humano.

Estudos sobre parasitismo gastrointestinal e pulmonar em javalis e veados caçados em montarias do centro e sul de Portugal Continental

Resumo

As infeções parasitárias são comuns nos ungulados silvestres, contudo a presença de coinfeções entre helmintes e outros agentes pode potenciar a sua patogenicidade. Neste estudo, foi investigada a presença de parasitas gastrointestinais e pulmonares em javalis e veados provenientes de área epidemiológica de risco de tuberculose bovina (TB), de forma a compreender se os endoparasitas contribuem para a manutenção da infeção por *Mycobacterium bovis*.

Recorreu-se à colheita de 124 amostras fecais de animais caçados na sub-região do Baixo Alentejo (n=73), Beira Interior Sul (n=7) e Lezíria do Tejo (n=44), sendo que as duas primeiras sub-regiões pertencem à área epidemiológica de risco de TB em caça maior. As amostras foram armazenadas à temperatura de refrigeração (5°C) ou de congelação (-18°C) e foram efetuados testes coprológicos de flutuação de Willis, sedimentação simples, McMaster, coprocultura em copo para isolamento de larvas no 3º estágio (L3) de nemátodes estrongilídeos gastrointestinais (EGI), método de Baermann para pesquisa de larvas no 1º estágio (L1) de nemátodes pulmonares e esfregaço fecal para pesquisa de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. Recorreu-se à análise de risco entre os parasitas encontrados (variáveis dependentes) e a conservação da amostra, sub-região, idade e sexo do animal (variáveis independentes).

Nos testes coprológicos verificou-se que as amostras refrigeradas se encontravam mais parasitadas do que as congeladas e como a conservação da amostra era um fator de risco, recorreu-se à separação das amostras em amostras refrigeradas e amostras congeladas. Na grande maioria dos animais detetou-se infeção parasitária (78,3%) em 83 animais, sendo a proporção maior nos javalis do que nos veados. Nas amostras refrigeradas de javali (n=43) observou-se a presença de EGI (97,7%), *Cryptosporidium* spp. (69,8%), *Metastrongylus* spp. (34,9%), coccídias (30,2%), *Trichuris suis* (14,0%), *Fasciola hepatica* (7,0%), Ascarídeos (4,7%) e os quistos de *Giardia* sp. não foram observados. Através da coprocultura observou-se L3 de *Oesophagostomum* spp. Com significado estatístico, animais do Baixo Alentejo têm uma probabilidade de excreção de oocistos de coccídias 3 vezes maior do que os da Lezíria do Tejo. A probabilidade de infeção por coccídias e de excreção de oocistos de *Cryptosporidium* nos jovens é 6,7 e 13,5 vezes maior do que em adultos, respetivamente. As amostras congeladas de javali eram de animais infetados e não infetados com TB, em que 62,5% encontravam-se parasitados. Ainda nas amostras congeladas de animais não infetados com TB encontrou-se 3 tipos de helmintes: EGI (25%), *Fasciola hepatica* (6,3%) e *Ascaris suum* (12,5%); e nas amostras congeladas de animais infetados com TB observou-se 4 tipos de helmintes: EGI (41,7%), *Metastrongylus* spp. (33,3%), família Eimeriidae (20,8%) e *Balantidium* spp. (4,2%).

Nas amostras refrigeradas de veado (n=34), os ovos de EGI foram os mais assinalados (73,5%), seguindo-se outros parasitas com uma presença muito inferior, *Eimeria* spp. (17,6%), *Strongyloides* sp. (14,7%), oocistos de *Cryptosporidium* spp. (11,8%) e ainda 5,9% para *Moniezia benedeni*, *Trichuris* spp. e *Fasciola hepatica*. Os quistos de *Giardia* spp. não foram observados no veado. Através do método de Baermann em fezes de veados observaram-se larvas L1 de *Elaphostrongylus* sp. (26,5%) e de *Varestrongylus* sp. (11,8%). Na coprocultura observou-se L3 de *Ostertagia* spp. e *Oesophagostomum* spp.. Com significado estatístico, os veados positivos a TB tinham 5 e 16,5 vezes mais probabilidade de excreção de ovos de estrongilídeos e de oocistos de *Cryptosporidium* spp., respetivamente, podendo revelar que os animais infetados com TB têm um sistema imunitário debilitado.

Com este estudo, foi possível concluir que os parasitas têm um papel importante na manutenção da tuberculose bovina em javalis e veados.

Palavras-passe: Javali, veado, *Mycobacterium bovis*, coinfeção, nemátodes gastrointestinais, nemátodes pulmonares, coccídias, área epidemiológica de risco para tuberculose bovina, Portugal.

Studies on gastrointestinal and pulmonary parasitism in wild boar and red deer hunted in the center and south of Portugal Mainland

Abstract

Parasitic infections are common in wild ungulates, although the presence of coinfections between helminths and other agents, may potentiate their pathogenicity. In this study, we investigated the presence of gastrointestinal and pulmonary parasites in wild boars and red deer from epidemiological area of bovine tuberculosis (TB) risk, in order to understand if the endoparasites contribute to the maintenance of *Mycobacterium bovis* infection.

The 124 Fecal samples were collected from animals hunted from Baixo Alentejo sub-region (n=73), Beira Interior Sul (n=7) and Lezíria do Tejo (n=44), being the first two belong to the epidemiological area of TB risk in hunting game. The samples were stored at refrigeration (5°C) or freezing temperature (-18°C) and coprological tests of Willis flotation, simple sedimentation, McMaster, faecal cultures for isolation of larvae in 3rd stage (L3) from gastrointestinal strongyles (GIS), Baermann method for larvae in the 1st stage (L1) research of pulmonary nematodes and fecal smear for *Cryptosporidium* spp.

Risk analysis was used, with a significance value of 0.05 and a confidence interval of 0.95, among the parasites found (dependent variables) and the conservation of the sample, sub-region, age and sex of the animal (independent variables).

In the coprological tests it was found that the refrigerated samples were more parasitized than those that were frozen, and as the conservation of sample was a risk factor, we separate the samples in refrigerated samples and frozen samples. In the majority of the animals parasitic infection was detected (78.3%; n=83), the proportion being higher in wild boars than in red deer. In refrigerated samples of boar (n=43) was observed the presence of GIS (97.7%), *Cryptosporidium* spp. (69.8%), *Metastrongylus* spp. (34.9%), coccidia (30.2%), *Trichuris suis* (14.0%), *Fasciola hepatica* (7.0%), Ascarídeos (4.7%) and cysts of *Giardia* sp. weren't found. Through faecal cultures larvae L3 of *Oesophagostomum* spp. were observed. With statistical relevance, Baixo Alentejo's animals have a probability of excretion of coccidian oocysts 3 times greater than those of the Lezíria do Tejo. The probability of coccidial infection and excretion of *Cryptosporidium* oocysts in younger animals is 6.67 and 13.5 times higher than in adults, respectively. The frozen wild boar samples were from infected and non-TB infected animals, where 62.5% were parasitized. In the frozen samples of non-TB infected animals 3 types of helminths were found: GIS (25%), *Fasciola hepatica* (6.3%) and *Ascaris suum* (12.5%); and in the frozen samples of TB infected animals, 4 types of helminths were observed: GIS (41.7%), *Metastrongylus* spp. (33.3%), Eimeriidae family (20.8%) and *Balantidium* spp. (4.2%).

In the refrigerated samples of red deer (n=34), the strongyle-type eggs were the most found (73.5%), followed by other parasites with a much lower presence, *Eimeria* (17.6%), *Strongyloides* sp. (14.7%), *Cryptosporidium* oocysts (11.8%) and also 5.9% for *Moniezia benedeni*, *Trichuris* spp. and *Fasciola hepatica*. The *Giardia* cysts weren't found. Through Baermann's method in deer faeces, L1 larvae of *Elaphostrongylus* sp. (26.5%) and *Varestrongylus* (11.8%) were observed. In the faecal culture was observed L3 of *Ostertagia* spp. And *Oesophagostomum* spp.. Statistically significant, TB positive deer had 5 and 16.5 times probability to excrete strongyle eggs and *Cryptosporidium* spp. oocysts, respectively; which may reveal that animals infected with TB have a weakened immune system.

With this study, it was possible to conclude that parasites play an important role in the maintenance of tuberculosis in wild boars and red deers.

Key-words: Wild boar, red deer, *Mycobacterium bovis*, coinfection, gastrointestinal nematodes, pulmonary nematodes, coccidian, epidemiological area of bovine tuberculosis risk, Portugal.

Índice Geral

1	Introdução	1
1.1	Descrição das atividades desenvolvidas durante o estágio	2
2	Revisão Bibliográfica	4
2.1	Caracterização da área de estudo	4
2.1.1	Beira Interior Sul	4
2.1.2	Lezíria do Tejo	4
2.1.3	Baixo Alentejo	6
2.2	Javali (<i>Sus scrofa</i>)	7
2.2.1	Taxonomia	7
2.2.2	Características Morfológicas	8
2.2.3	Organização Social e Ciclo Anual	8
2.2.4	Habitat e Alimentação	9
2.2.5	Impacto da Espécie	9
2.3	Veado (<i>Cervus elaphus</i>)	10
2.3.1	Taxonomia e Distribuição	10
2.3.2	Características Morfológicas	10
2.3.3	Organização Social e Ciclo Anual	11
2.3.4	Habitat e Alimentação	11
2.3.5	Impacto da Espécie	11
2.4	Parasitas do Javali e porco em regime extensivo no mundo e em Portugal	12
2.4.1	No mundo	12
2.4.1.1	Europa	12
2.4.1.2	Médio Oriente	15
2.4.1.3	Ásia	15
2.4.1.4	América	16
2.4.2	Em Portugal	16
2.5	Parasitas do veado no mundo e em Portugal	18
2.5.1	No mundo	18
2.5.1.1	Europa	18
2.5.2	Em Portugal	22
2.6	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	23
2.6.1	Interação entre macroparasitas e microparasitas	24
3	Objetivos	28
4	Material e Métodos	29
4.1	Colheita de Amostras	29
4.1.1	Identificação da Amostra	30
4.2	Análise de Amostras Fecais	34
4.2.1	Técnica de McMaster	34
4.2.2	Método de Willis ou Flutuação	35
4.2.3	Sedimentação Simples	35
4.2.4	Técnica de Baermann	36
4.2.5	Esfregaço Fecal para pesquisa de <i>Cryptosporidium</i> spp.	36
4.2.6	Coprocultura em Copo	37
4.3	Análise Estatística	39
5	Resultados	40
5.1	Parasitas Observados nas amostras de Javali	40
5.1.1	Prevalência Global	40
5.1.2	Análise de Fatores de Risco	40
5.1.3	Amostras refrigeradas (de animais não infetados com TB)	41
5.1.3.1	Testes Qualitativos para parasitas gastrointestinais, hepáticos e pulmonares	42

5.1.3.2	Testes Quantitativos para parasitas da subordem Strongylida e protozoários.....	44
5.1.3.3	Teste Quantitativo para larvas infetantes (L3) da subordem Strongylida	47
5.1.3.4	Análise de Factores de Risco	47
5.1.4	Amostras congeladas (de animais infetados e não infetados com TB)	48
5.2	Parasitas Observados nas amostras de Veado	50
5.2.1	Prevalência Global	50
5.2.1.1	Análise de Factores de Risco	50
5.2.2	Amostras refrigeradas (de animais infetados e não infetados por TB)	51
5.2.2.1	Testes Qualitativos para parasitas gastrointestinais, hepáticos e pulmonares	51
5.2.2.2	Testes Quantitativos para parasitas da subordem Strongylida e protozoários.....	54
5.2.2.3	Testes Quantitativos para larvas L3 da subordem Strongylida	54
5.2.2.4	Análise de Factores de Risco	54
5.2.3	Amostras congeladas (de animais infetados com TB)	55
6	Discussão.....	56
6.1	Parasitas observados nas amostras de Javali	56
6.1.1	Análise dos fatores de risco.....	56
6.1.2	Amostras refrigeradas.....	56
6.1.3	Amostras congeladas	63
6.2	Parasitas observados nas amostras de Veado.....	64
6.2.1	Análise dos fatores de risco.....	64
6.2.2	Amostras refrigeradas.....	65
6.3	Amostras congeladas	69
7	Conclusão	70
8	Perspectivas Futuras	72
9	Bibliografia	73
10	Anexos.....	81
	Anexo 1. Cultura bacteriológica para pesquisa de <i>Mycobacterium bovis/caprae</i> em amostras de gânglios linfáticos de javalis e veados.....	81
	Anexo 2. Poster apresentado na VI Reunião de Ungulados Silvestres Ibéricos (RUSI).....	83

Índice de Figuras

Figura 1: Uma das entradas da Companhia das Lezírias (original)	5
Figura 2: Planície alentejana durante a estação húmida (original)	6
Figura 3: Javali (<i>Sus scrofa</i>).....	7
Figura 4: Dois exemplares de <i>Cervus elaphus</i>	10
Figura 5: Colheita de fezes após a inspeção sanitária do médico veterinário.....	29
Figura 6: Veados e javalis caçados numa das montarias localizadas no Baixo Alentejo. (original)	29
Figura 7: Equipamento de proteção individual necessário para manusear fezes de animais potencialmente infetados com tuberculose bovina (original)	33
Figura 8: Revestimento feito na mesa de trabalho com plástico forrado com papel absorvente, com o auxílio de fita-cola. Sobre a mesa a presença de algum material necessário para os testes coprológicos, realizados na Sala de Necrópsias. (original)	34
Figura 9: Técnica de McMaster. Câmaras de McMaster preparadas para observação microscópica. (original)	34
Figura 10: Técnica de Flutuação. Tubos de ensaio com amostra e solução saturada de sacarose, com a lamela colocada no topo do tubo. (original)	35
Figura 11: Lamela sobre lâmina com sobrenadante. (original)	35
Figura 12: Técnica de Baermann. Copo cónico com água morna e fezes envolvidos em gaze (original).	36
Figura 13: Copos de coprocultura invertidos sobre a placa de Petri. (original)	37
Figura 14: Tubos de ensaio com líquido que se encontrava na placa de Petri. (original).....	37
Figura 15: <i>Metastrongylus</i> sp. em amostra de javali, observado através do teste de sedimentação. (original)	43
Figura 16: <i>Trichuris suis</i> observado através do teste de sedimentação. (original).....	43
Figura 17: <i>Ascaris suum</i> observado através da técnica de Baermann. (original)	43
Figura 18: Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp. em amostras de javali, observados através do esfregaço fecal. Neste esfregaço contabilizaram-se 115 oocistos em 50 campos. (original).....	46
Figura 19: Ovo do tipo estrongilídeo em amostra congelada de javali, observado através da técnica de Baermann. (original)	49
Figura 20: Ovo de <i>Ascaris suum</i> em amostra congelada, observado através da técnica de Baermann. (original)	49
Figura 21: Ovo de <i>Metastrongylus</i> sp. com L1 em amostra congelada de javali. Observado através da técnica de Baermann. (original).....	49
Figura 22: Ovos do tipo estrongilídeo em amostras de veado. Teste coprológico utilizado – Flutuação (original)	52
Figura 23: Ovo de <i>Strongyloides</i> sp. em amostra de veado. Teste coprológico – Flutuação (original) ..	52
Figura 24: <i>Moniezia benedeni</i> em amostra de veado. Teste coprológico utilizado – Flutuação (original)	53
Figura 25: Larva L1 de <i>Elaphostrongylus</i> sp. observada através da técnica de Baermann. (original) ...	53
Figura 26: Pormenor da cauda da larva L1 de <i>Elaphostrongylus</i> sp. com espinha dorsal. Teste coprológico utilizado – Técnica de Baermann. (original).....	53
Figura 27: Oocistos de <i>Eimeria</i> assinalados em amostras de veados. A e B em amostras frescas de animais não infetados. As setas indicam os oocistos de <i>Eimeria</i> . C em amostra fresca de animal infetado com TB. Teste coprológico utilizado: Flutuação. (original)	53

Índice de Tabelas

Tabela 1: Prevalência global de parasitas em amostras fecais antemortem e postmortem recolhidas a porcos ibericos	13
Tabela 2: Prevalência global de parasitas observados em amostras de fezes colhidas postmortem de javalis em lotes de jovens, adultos e sem informação sobre a idade.....	13
Tabela 3: Distribuição da conservação de amostras de animais infetados e não infetados por TB	32
Tabela 4: Análise Multivariada das amostras de javalis.....	40
Tabela 5: Média, máximo, mediana e mínimo da contagem de ovos por grama (OPG)	44
Tabela 6: Média, máximo, mediana e mínimo da contagem de oocistos por grama (OoPG)	45
Tabela 7: Média, máximo, mediana e mínimo da contagem oocistos por 50 campos de esfregaço (Oo50C)	45
Tabela 8: Análise Multivariada das amostras refrigeradas de javalis não infetados com tuberculose bovina	48
Tabela 9: Análise dos fatores de risco em amostras de veado	50
Tabela 10: Análise multivariada em amostras refrigeradas de veado.....	55

Índice de Gráficos

Gráfico 1: Mapa coroplético com o número de amostras recolhidas por concelho	30
Gráfico 2: Distribuição de idade e sexo das amostras de Javali	31
Gráfico 3: Distribuição do sexo e idade das amostras de Veado.....	31
Gráfico 4: Nº de amostras positivas e negativas para ovos tipo strongilídeo através do teste de Willis conforme o método de conservação (prevalência).....	41
Gráfico 5: Distribuição do parasitismo apenas por helmintes e por helmintes com protozoários nas amostras refrigeradas de javali	42
Gráfico 6: Distribuição dos parasitas mais encontrados em cada teste coprológico.	43
Gráfico 7: Distribuição da frequência relativa percentual de animais por classes de contagem de ovos por grama (OPG).....	44
Gráfico 8: Distribuição da frequência relativa percentual de animais por classes de contagem de oocistos por grama (OoPG)	45
Gráfico 9: Distribuição da frequência relativa percentual de animais por classes de contagem de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp. em 50 campos de esfregaço fecal (Oo50C).....	45
Gráfico 10: Contagem de ovos do tipo strongilídeo por grama de fezes de javali nas diferentes sub-regiões.....	47
Gráfico 11: Distribuição do parasitismo em animais apenas com helmintes, com helmintes e protozoários, apenas com protozoários e sem parasitas nas amostras refrigeradas de veado	51
Gráfico 12: Distribuição de parasitas encontrados em veados nos testes coprológicos qualitativos, conforme a presença/ausência de tuberculose. Cada teste coprológico apresenta a percentagem de amostras positivas	52
Gráfico 13: Distribuição da frequência relativa percentual de animais por classes de contagem de ovos por grama (OPG).....	54
Gráfico 14: Distribuição da frequência relativa percentual de animais por classes de contagem de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. em 50 campos de esfregaço fecal (Oo50C).....	54

Lista de Abreviaturas

< - Menor
> - Maior
BSL3 – Laboratório de Biossegurança de nível 3
cm – centímetros
CMT – Complexo *Mycobacterium tuberculosis*
DIE – Doenças Infeciosas Emergentes
ha – Hectares
IC_{95%} - Intervalo de confiança de 95%
INF – Interferão
kg – quilogramas
km² – quilômetros quadrados
L1 – 1º estágio larvar
L3 – 3º estágio larvar
máx. – Máximo
min. – Mínimo
ml – mililitros
mm – milímetros
N – Número total de amostras
n.a. – Não aplicável
Oo50C – oocistos por 50 campos
OoPG – Oocistos por grama
OPG – Ovos por grama
OR – Odds ratio
P - Prevalência
 p – valor de p
rpm – Rotações por minuto
sp. – Espécie
spp. – Espécies
TB - Tuberculose bovina
ZCA – Zona de caça associativa
ZCM – Zona de caça municipal
ZCN – Zona de caça nacional
ZCT – Zona de caça turística

1 Introdução

O conceito Uma Saúde já não é novo, mas continua a ser aceite no controlo de doença moderna – onde as interações entre a saúde animal, humana e o meio ambiente em que vivemos são conhecidos como sendo de grande importância. Contudo, as doenças infecciosas emergentes (DIE) com potencial zoonótico têm dominado a atenção dos cientistas (Thompson, Lymbery & Smith, 2010). Assim, não só os estudos sobre a biodiversidade e ecologia de parasitas de animais silvestres foram negligenciados, mas também os potenciais impactos de doenças infecciosas de populações silvestres, que têm sido muitas vezes ofuscados pelas questões antropocêntricas aparentemente mais prementes (Jenkins, Simon, Bachand & Stephen, 2010; Thompson *et al.*, 2010). Mais recentemente, em resposta ao aumento global das DIE, os cientistas, que se focavam nos fatores externos do hospedeiro, como clima, habitat, alterações de densidade do hospedeiro e interações sociais que influenciam a dinâmica da transmissão do agente, começaram a incorporar nesses estudos, fatores internos (Ezenwa & Jolles, 2011). De facto, as interações entre parasitas e agentes causadores de doenças como SIDA, tuberculose e malária são atrativas para o mundo científico, porque podem facilitar ou desfavorecer a transmissão e progressão destas doenças.

A vida selvagem é um excelente modelo para observar se as coinfeções contribuem para o aumento da gravidade de doenças infecciosas como a tuberculose bovina (Bordes & Morand, 2011).

Por esta e outras razões, e citando Robertson, Utaaker, Goyal & Sehgal (2014): “Parasitic infections, (...) must ensure that they retain their place under the One Health umbrella”.

Com base nestas premissas, realizámos um estudo das parasitoses gastrointestinais e pulmonares do javali (*Sus scrofa*) e veado vermelho (*Cervus elaphus*), oriundos de três regiões, duas delas da área epidemiológica de risco para a tuberculose bovina de caça maior, procurando avaliar as interações entre estes diferentes agentes e os ungulados silvestres como respectivos hospedeiros.

1.1 Descrição das atividades desenvolvidas durante o estágio

No âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, foi realizado um estágio curricular na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL), de 3 novembro de 2014 a 9 julho de 2015. O trabalho laboratorial foi realizado no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias, com a colaboração do sector de Anatomia Patológica da FMV-UL e o trabalho de campo para colheita de amostras fecais foi efectuado em montarias do Centro e Sul do país. Foram realizadas quatro saídas de campo durante a época venatória, uma na Lezíria do Tejo e três no Baixo Alentejo, com acompanhamento do Orientador, entre o final do mês de novembro de 2014 e o fim do mês de janeiro de 2015. As colheitas de amostras fecais foram efetuadas após o ato cinegético de ungulados silvestres (javalis e veados) e após a devida inspeção sanitária das carcaças. Desta forma, foi possível observar lesões de linfonodos compatíveis com lesões causadas pela micobactéria *Mycobacterium bovis*.

O trabalho laboratorial compreendeu o processamento de amostras de fezes, através da realização das seguintes técnicas coprológicas: métodos qualitativos de flutuação de Willis, sedimentação natural, técnica de Baermann e esfregaço fecal para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp.; métodos quantitativos de McMaster, coprocultura em copo para contagem e identificação de larvas L3, obtidas a partir de ovos de estrongilídeos gastrointestinais (em fezes de javali e veado), e contagem de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 50 campos de esfregaço fecal.

As amostras negativas a tuberculose bovina (TB) foram processadas no laboratório de Parasitologia, enquanto as amostras positivas a TB foram analisadas na sala de necrópsias com as precauções devidas, tais como: revestimento da mesa de trabalho com plástico resistente e papel absorvente descartados após cada utilização, material de laboratório e máscara de olhos desinfetados com micobactericida (Bacillol®) sempre que fora utilizado, assim como a mesa de trabalho; dois pares de luvas, fato-macaco, protetor de pés, protetor de mangas, avental e máscara bucal “bico de pato” descartáveis.

Durante este estágio, também foi possível auxiliar o orientador na lavagem traqueobrônquica de pulmões de javalis para estudo das vias de excreção do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), para o seu trabalho de doutoramento.

Nos dias 21 a 23 de abril e 8 de junho de 2016 foi possibilitada a visita ao Laboratório associado ICVS/3B's do Instituto de Investigação em Ciências da Vida e Saúde (ICVS) sediado em Braga na Escola de Ciências da Saúde (ECS) da Universidade do Minho. Com a supervisão e acompanhamento do orientador, foi possível apreender as técnicas laboratoriais para pesquisa de *Mycobacterium bovis/caprae* em amostras de linfonodos de javalis e veados, em laboratório de biossegurança de nível 3 (BSL3) para cultura bacteriológica (Anexo 1), que fizeram parte integrante do projeto de investigação no âmbito do trabalho de doutoramento do Doutor Nuno Santos (orientador). Para se trabalhar no laboratório BSL3 teve que se seguir,

criteriosamente, uma série de práticas e procedimentos antes, durante e após a permanência neste laboratório. Primeiro, tem de haver a notificação ao investigador principal responsável, fornecer ao trabalhador visitante o manual "*Exposure Control Plan – Biosafety Procedure and Practice Manual for the BSL-3 facilities*". O visitante terá, ainda, de realizar o teste IGRA que mede a quantidade de INF- γ libertada em resposta a antígenos de *Mycobacterium*, para saber se o visitante está ou não infetado pela micobactéria antes de entrar no laboratório BSL3.

Durante a estadia no laboratório BSL3, o trabalhador tem de estar devidamente equipado com fato-macaco, dois pares de luvas com fita adesiva, máscara "bico de pato", proteção de pés e touca. Após a realização do trabalho, faz-se desinfecção de todas as superfícies e antes de sair do laboratório, o trabalhador tem de remover primeiro um par de protetor de pés e passar para o tapete aderente localizado na entrada do laboratório. De seguida, remove a fita adesiva, um par de luvas e, cuidadosamente, o fato de macaco. Por último, retira o outro par de luvas, a máscara bucal, a touca e sustenta a respiração, o máximo possível, até sair do laboratório.

Durante a redação do presente estudo foi possível ao autor fazer uma comunicação em poster dos dados preliminares na VI Reunião de Ungulados Silvestres Ibéricos (RUSI), com o tema "Parasitismo Gastrointestinal e Pulmonar de Ungulados Silvestres em Montarias do Centro e Sul de Portugal Continental", decorrido de 4 a 5 de setembro de 2015 em São Pedro do Sul, Portugal (Anexo 2).

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Caracterização da área de estudo

A lei da caça publicada em agosto de 1986, promoveu o aumento das áreas de caça, especialmente as associativas (ZCA) e turísticas (ZCT). Em 2004, existiam 1700 ZCA e 720 ZCT, com uma área total de 3,2 milhões hectares (ha) (Lopes & Borges, 2004).

A zona de caça é uma área onde é permitida a atividade cinegética ordenada. Em 2015, existiam 4817 zonas de caça em Portugal Continental, abrangendo uma área total de cerca 7,1 milhões de hectares (79% do território continental). As zonas são divididas de acordo com a entidade gestora ou com o fim a que lhe é destinado: zona de caça associativa (ZCA) gerida por clubes ou associações de caçadores, zona de caça turística (ZCT) quando a gestão está direcionada para exploração económica de meios cinegéticos, zona de caça nacional (ZCN) quando a gestão é feita pelo estado e zona de caça municipal (ZCM), no caso das entidades de gestão serem da autarquia ou de associações de caçadores, e que tenham por fim a prática organizada da caça com número máximo de caçadores. No ano anterior, as ZCA compunham a maioria do número de zonas de caça do continente (53,6%), ZCT (26,7%), ZCM (19,5%) e com uma pequena percentagem (0,3%) as ZCN, militares e do Ministério da Justiça. Relativamente à área das zonas de caça as ZCA abrangem cerca de 43,9%, ZCM 37,4% e as ZCT com 18% do território de caça (Instituto Nacional de Estatística [INE], 2016).

O presente estudo foi conduzido no centro (Beira Interior e Lezíria do Tejo) e sul (Baixo Alentejo) de Portugal Continental, em três ZCA do concelho de Idanha-a-Nova, localizado na sub-região Beira Interior Sul; na Companhia das Lezírias, localizada na sub-região Lezíria do Tejo, e ainda, em três concelhos do distrito de Beja (Barrancos, Moura e Serpa) localizados na sub-região Baixo Alentejo.

2.1.1 Beira Interior Sul

A Beira Interior é caracterizada por ser uma região montanhosa (1993m de altitude máxima) com pastagens e colinas típicas, com médias anuais de 7,8°C e 16,7°C de mínimo e máximo, respetivamente. A sul encontra-se o distrito de Idanha-a-Nova onde os verões são quentes e os invernos frios. As florestas são compostas principalmente por sobreiro *Quercus suber* e azinheira *Quercus rotundifolia* e de arbustos como *Genista hirsutae* - *Cistetum ladaniferi* e *Scillo-Lavanduletum sampaioanae* (Fonseca *et al.* 2004).

2.1.2 Lezíria do Tejo

Esta sub-região portuguesa é caracterizada por aluviões (lezírias) onde se pratica agricultura de regadio. A “Companhia das Lezírias, S.A.” (Figura 1) é delimitada pelo rio Tejo e Sorraia e separada em Lezíria Norte e Lezíria Sul pela Recta do Cabo. É a maior propriedade

agropecuária e florestal que existe em Portugal e distribuída em Lezíria de Vila Franca de Xira, a Charneca do Infantado, o Catapereiro e os Pauis. Esta propriedade tem três zonas de caça: duas ZCA e uma ZCT (com 8.425 ha) localizadas na Charneca da Companhia das Lezírias (Companhia das Lezírias, 2016). Esta área encontra-se entre 0-50 m de altitude (APAmbiente, 2016). A exploração agropecuária especializa-se na carne de bovino de duas raças autóctones (Preta e Mertolenga) em pastoreio durante todo o ano e produção equina. A área florestal total é de 8.680 ha, dividida em quatro espécies principais com predomínio do sobreiro *Quercus suber* (montados de 6.725 ha), seguido de pinheiro bravo *Pinus pinaster* (971 ha), em terceiro o pinheiro manso *Pinus pinea* (508 ha) e por fim eucalipto *Eucalyptus* sp. (476 ha).

Figura 1: Uma das entradas da Companhia das Lezírias (original)



Existem plantações de vinha, olival e culturas agrícolas com produção plurianual (cevada *Hordeum vulgare*, aveia *Avena sativa*, sorgo *Sorghum bicolor*, milho *Zea mays* e arroz *Oryza* spp.) (Companhia das Lezírias S.A., 2015; Companhia das Lezírias, 2016).

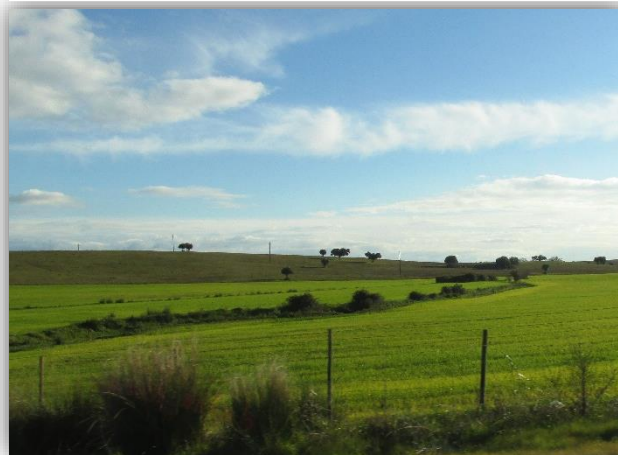
Em 2015, foi relatado no “Resumo do Sistema de Monitorização” que foram efetuadas 797 jornadas de caça (menos 27% do que o ano anterior (1090) em que foram abatidos 138 javalis (mais 7% do que o ano anterior (128), não atingindo a meta que seria de 150 javalis abatidos) (Companhia das Lezírias, 2016).

2.1.3 Baixo Alentejo

A sub-região Baixo Alentejo está inserida na extensa Região do Alentejo. O clima é mediterrânico, com temperatura média anual entre os 15°C e os 17,5°C, com valores mais elevados na margem esquerda do Guadiana, que podem chegar aos 40,8°C de temperatura máxima. A precipitação anual média ronda os 729,5 mm por ano, com janeiro e fevereiro a constituírem os meses mais húmidos (Figura 2) e ausente no período mais quente, condicionando o fornecimento de alimento à fauna, especialmente, nos pastos herbáceos (CIMBAL, 2016).

A flora característica desta região é de árvores esparsas, principalmente azinheira *Quercus rotundifolia*, sobreiro *Quercus suber* e alguns cereais, como aveia *Avena sativa* e trigo *Triticum* sp. No outono e inverno as pastagens estão repletas de girassol *Helianthus annuus* e na primavera e verão de milho *Zea mays*. Nos terrenos montanhosos mais robustos emergem arbustos densos, ideais para o javali se refugiar (Fonseca *et al.*, 2004).

Figura 2: Planície alentejana durante a estação húmida
(original)



Além de apresentar uma fauna e flora diversificada e bastante rica, também constitui um corredor natural para populações de lince-ibérico *Lynx pardinus* e de abutre-preto *Aegypius monachus* de Espanha.

2.2 Javali (*Sus scrofa*)

2.2.1 Taxonomia

O javali (Figura 3) (*Sus scrofa*, Linnaeus 1758) pertence ao reino Animalia, filo Chordata, classe Mammalia, ordem Artiodactyla e família Suidae.

Figura 3: Javali (*Sus scrofa*)



Existem oito espécies que formam o género *Sus*: *Sus scrofa* (javali euroasiático), *Sus salvanius* (javali pigmeu), *Sus verrucosus*, *Sus barbatus*, *Sus cebifrons*, *Sus celebensis*, *Sus philippensis* (javali das Filipinas) e *Sus bucculentus* (javali do Vietname) (Rosell, Fernández-Llario & Herrero, 2001). O javali euroasiático tem uma área de distribuição ampla, abrangendo desde a Europa, Ásia, chegando ao norte de África, Médio Oriente, Índia, Sri Lanka e Indonésia. O seu estado de conservação é pouco preocupante, como está

referido na Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (Oliver & Leus, 2008). A subespécie predominante na Península Ibérica e que foi base de estudo é a *S. scrofa scrofa*.

Em Portugal, desde a Idade Média que havia regras e sanções para quem caçasse javalis. No início do século XVII, houve restrições à criação de porcos domésticos, de forma a evitar o cruzamento com javalis e, no final do século XVIII (1781) a caça ao javali foi proibida. No primórdio do século XX, esta espécie encontrava-se confinada em zonas fronteiriças (Gerês, Montesinho, Malcata, S. Mamede e Barrancos, Tapadas Reais, Serras Algarvias) (Lopes & Borges, 2004). Nos anos 1960, o javali era considerado quase extinto, principalmente, devido à peste suína africana e ao excesso de caça, sem condições de proteção às espécies cinegéticas. A recuperação do javali começou no início de 1980, em que as populações refugiadas em áreas montanhosas começaram a expandir para o litoral. O javali encontra-se distribuído por todo o país, com exceção dos grandes centros urbanos e de algumas porções do cordão litoral (Fonseca *et al.*, 2004). Os fatores contribuintes desta expansão foram: a diminuição da população rural, aumento de requisitos de proteção a espécies cinegéticas, incluindo o javali, estabelecimento de zonas de caça e a redução de populações de predadores como é o caso do lobo (Lopes & Borges, 2004).

2.2.2 Características Morfológicas

O tamanho do javali é variável, consoante a latitude e alimento disponível. Têm dimorfismo sexual pouco demarcado, podendo atingir cerca de 100 kg de peso vivo nos machos e nas fêmeas 70 kg. Quanto aos elementos dentários, os caninos são muito característicos da espécie, conhecidos por navalhas e constituírem um importante mecanismo de defesa. A pelagem típica dos exemplares adultos, apresenta uma coloração de tons pardos com as extremidades e orelhas mais escuras e pêlo grisalho na cabeça. O tipo de pelagem varia com a estação do ano: no verão é curto e pouco denso, no inverno o pêlo é comprido. Também varia com a idade: ao nascer até aos 5-6 meses são amarelados com 11 listas castanhas longitudinais mais escuras no flanco, designados por “listados” ou “listões”. Depois mudam a pelagem, passando a um tom uniforme mais acastanhado até aos 10-12 meses. A partir desta faixa etária, adquirem coloração característica da espécie (Rosell *et al.*, 2001).

2.2.3 Organização Social e Ciclo Anual

A organização social nesta espécie, tem como base unitária, o grupo matriarcal é liderado, pela fêmea maior ou de classe social mais elevada. Esta estabelece uma rede de inter-relações, que facilitam o desenvolvimento do processo de aprendizagem, das estratégias individuais e coletivas. Junto deste encontram-se as crias, machos e fêmeas, desse ano e ainda as fêmeas subadultas que nasceram no ano anterior. À periferia destes grupos encontram-se os machos adultos e subadultos. Os machos adultos que se encontram solitários durante a maior parte do ano, aproximam-se aos grupos de fêmeas e crias durante o período de cio, levando à expulsão das crias do sexo masculino (Fernández-Llario, 2005). A época onde se observa uma grande variabilidade e dinamismo da estrutura social é na altura em que há um maior número de cópulas e partos e de combates entre machos. A fêmea tem um período de gestação cerca de 120 dias. Os jovens machos iniciam a puberdade entre os 10 meses e os 2 anos de vida, mas ainda não estão preparados para competir pelas fêmeas adultas, embora estas se encontrem em condições para a reprodução entre os 8 e 11 meses de idade, altura em que atingem os 30 kg de peso (Fernández-Llario & Mateos-Quesada, 1998).

A média de crias por parto é de 3,5 nas zonas mediterrâneas, mas há uma variação geográfica podendo atingir 3,3 de mínima nos Pirinéus Aragoneses, segundo Herrero (2002) e 5,01 de máxima em Girona, como refere Rosell, Navas e Romero (2012). O estudo de Fonseca, da Silva, Alves, Vingada e Soares (2011), referiu que no centro de Portugal a média de fetos por parto foi de 4,1. Caso haja disponibilidade de alimento ótima, como bolota e frutos pode atingir uma média de 5,3 fetos por ninhada (Rosell, 1998).

O período de conceção é compreendido, normalmente, entre os últimos dias de outubro e os primeiros de novembro, altura em que se sucede a queda da bolota (Fernández-Llario, 2005; Santos *et al.*, 2005). O javali português exhibe padrões de reprodução sazonais mais

pronunciados no norte e centro do país (Fonseca *et al.*, 2004). Nestas regiões, o período de concepção é compreendido entre os últimos dias de outubro e os primeiros de novembro, (Fernández-Llario, 2005; Santos *et al.*, 2005) e o período de nascimentos estende-se entre janeiro e abril, diretamente relacionados com a sazonalidade climática e a disponibilidade de alimento (Fonseca *et al.*, 2004). No Alentejo, a duração do período de reprodução é mais alongada, devido à alta disponibilidade de alimentos nos finais de outono e inverno (Fonseca *et al.*, 2004). Além disso, a presença de fêmeas lactantes por volta de novembro/dezembro e fêmeas no pós-parto no início do inverno, sugere a existência de um segundo período reprodutivo entre agosto/setembro nesta região (Fonseca *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2005).

2.2.4 Habitat e Alimentação

O javali é um omnívoro oportunista, capaz de colonizar todo o tipo de ambientes e variando a sua dieta conforme a disponibilidade e abundância de alimentos (Fonseca *et al.*, 2004). Com base nas estatísticas de caça de javalis na Península Ibérica, estima-se que a densidade média seja de 0,31/km² (Bosch *et al.*, 2012). A atividade do javali é, preferencialmente, crepuscular e noturna. Este ungulado utiliza o espaço de acordo com a disponibilidade de alimento (zonas mais frequentadas) e a altura da reprodução (altura da época de partos nas zonas que oferecem maior segurança) (Rosell *et al.*, 2001).

A dieta é composta, maioritariamente, por alimentos de origem vegetal e uma pequena parte por pequenos invertebrados (Rosell, 1998; Herrero, 2002). Uma das particularidades do javali é o foçar a terra à procura de alimentos hipogeus (larvas de insetos, raízes, bulbos).

2.2.5 Impacto da Espécie

Este ungulado é um autêntico dispersante de sementes, mas também ocasiona danos nos terrenos agrícolas, assim como nos pastos dos montes devido ao fossar da terra. A sua capacidade de tolerar a presença humana, permite estabelecer-se nos arredores de núcleos urbanos, tendo um comportamento oportunista. Outro problema, que se tem intensificado, são as colisões com veículos, causando acidentes (Rosell *et al.*, 2001). Como presa, é de destacar a predação do lobo sobre as camadas mais jovens. Os listados são vítimas de ataques de águias, raposas e linces. O javali, tanto pelo seu tamanho, como pela sua dieta, também alberga inúmeros parasitas e doenças (Fernández-Llario, 2014).

2.3 Veado (*Cervus elaphus*)

2.3.1 Taxonomia e Distribuição

Do latim *venatu* “caça morta”, pertence ao reino Animalia, filo Chordata, classe Mammalia, ordem Artiodactyla, subordem Ruminantia, família Cervidae e género *Cervus* e espécie *Cervus elaphus* (Figura 4).

Figura 4: Dois exemplares de *Cervus elaphus*



A subespécie ibérica só existe em Portugal e Espanha e encontra-se bem diferenciada do resto das doze subespécies, que se distribuem pela Eurásia e Magreb (Carranza, 2011). Esta diferenciação deve-se ao efeito das últimas glaciações.

No caso de Portugal, as populações desapareceram na sua maior parte durante a primeira metade do século XX. No entanto, com a colonização a partir de Espanha, a distribuição

durante os últimos séculos tem estado localizada na metade sudoeste da Península Ibérica (habitats ocupados por bosque e matagal mediterrâneo esclerófilo) (Carranza, 2011).

Actualmente, o veado encontra-se espalhado por todo o país, sendo que as populações mais significativamente alargadas se localizam na Contenda, Barrancos, ao longo da região do Tejo Internacional e na serra da Lousã e de Montesinho (Vingada, Fonseca, Cancela, Ferreira & Eira, 2010).

2.3.2 Características Morfológicas

O veado possui uma pelagem castanha uniforme, com a zona ventral com um tom mais claro e um escudo anal mais claro, quase branco, ladeado por bandas escuras e com a cauda curta, também esta, castanha mais clara. Até aos três meses de vida têm uma pelagem característica castanha e manchas brancas.

Têm dimorfismo sexual por tamanhos: os machos, a partir dos dois anos de idade têm um comprimento total entre 160 a 220 cm, e o seu peso entre os 80 e 160 kg. As fêmeas a partir dos dois anos têm comprimento total de 160 a 195 cm e peso entre 50 e 100 kg. O crescimento corporal e o desenvolvimento das hastes estão fortemente relacionados com a densidade populacional e com as condições do ambiente. Outra característica que difere o macho da fêmea, é que aquele exibe hastes. Os machos desenvolvem as hastes de origem óssea a partir do primeiro ano, sendo renovado todos os anos, e que é formada por um tronco central que se ramifica em pontas. No primeiro ano, normalmente, a haste não é ramificada. Ao

segundo ano, já pode chegar a ter 6 pontas, e tende a aumentar o seu tamanho e número de pontas nos anos seguintes. O desenvolvimento máximo das hastes ocorre por volta dos 7 ou 8 anos e alguns exemplares chegam mesmo a ultrapassar o metro de comprimento e ostentar 20 pontas (Carranza, 2011).

2.3.3 Organização Social e Ciclo Anual

O veado tem uma atividade principalmente crepuscular. É um animal moderadamente gregário, mantendo relações entre si. Os machos e as fêmeas estão em grupos separados, durante grande parte do ano, excetuando a altura do cio (Carranza, 1986, Carranza & Valencia, 1992).

Os machos atingem a maturidade sexual aos 2 a 3 anos de idade e as fêmeas aos 1 a 2 anos. A época de cio do veado tem lugar entre setembro e outubro. A gestação dura 235-240 dias, de forma que os partos são a partir do mês de maio, coincidindo com a época de maior disponibilidade alimentar, crucial no final da gestação e princípio da lactação. Na época do acasalamento, os machos emitem um som característico, a brama. Esta é altura em que os machos rivais disputam, através de lutas, o seu lugar para formarem o seu harém, que pode ultrapassar as 50 fêmeas (Carranza, 2011).

2.3.4 Habitat e Alimentação

O veado ibérico ocupa ecossistemas mediterrâneos na metade do sul da Península Ibérica. A alimentação deste animal passa por uma mistura entre o pastoreio de herbáceas, predominantes do final do outono à primavera, e de plantas lenhosas no verão. Os machos e fêmeas, devido ao seu dimorfismo sexual em tamanho, competem de forma diferente para o alimento; sendo que as fêmeas, por serem mais baixas, cortam a erva a uma menor altura (Bugalho, Milne & Racey, 2001).

2.3.5 Impacto da Espécie

O veado, por ser um herbívoro adaptado a uma alimentação variada, compete com outras espécies de herbívoros (domésticos e silvestres). Esta espécie é a presa, pontualmente, do lobo, em locais onde as populações de lobos são abundantes e onde há uma presença reduzida de outros ungulados, tais como: o corço, javali e animais domésticos (Carranza, 2011).

O veado apresenta uma diversidade de parasitas destacando os nematodes pulmonares e parasitas gastrointestinais. O manejo inadequado a populações de veados, incluindo o contacto com animais domésticos são motivos que levam à propagação de doenças infecciosas como a tuberculose bovina (Castillo *et al.*, 2011).

2.4 Parasitas do Javali e porco em regime extensivo no mundo e em Portugal

2.4.1 No mundo

2.4.1.1 Europa

Um estudo feito no nordeste e centro de Espanha, contabilizou nemátodes adultos e analisou amostras de fezes de 59 javalis, para avaliar se a contagem de ovos fecais era um indicador fiável e avaliar os efeitos do armazenamento das amostras de javali na exactidão da contagem de ovos fecais (Gassó *et al.*, 2015). Os pulmões e tratos intestinais foram conservados a temperatura de -20°C e as amostras fecais a temperatura de 4°C. A prevalência de nemátodes adultos e ovos nas fezes foram, respetivamente: *Metastrongylus* spp. (84,3%; 58,9%), *Ascaris suum* (36,2%; 25%), *Trichuris suis* (43,1%; 33,9%). Os ovos de strongilídeos tiveram uma prevalência de 58,9% e a intensidade média da infeção foi de 404,5 OPG (min. 50 – máx. 2500). Os nemátodes adultos intestinais tiveram uma prevalência de: *Ascarops strongylina* (72,4%), *Physocephalus sexalatus* (15,5%), *Hyostrongylus rubidus* (8,6%); *Globocephalus urosubulatus* (44,8%), *Macracanthorhynchus hirudinaceus* (12,1%) e *Oesophagostomum* sp. (13,8%). Neste estudo, foi demonstrado que a técnica de contagem de ovos fecais é útil para nemátodes, como *T. suis*, *Metastrongylus* spp. e *A. suum*. Chegou-se à conclusão que, a precisão desta técnica diminui ao longo do tempo, especialmente, a partir do 20º dia após recolha da amostra fecal, sendo recomendado o processamento de amostras dentro de cinco dias, desde a sua colheita (Gassó *et al.*, 2015).

Neves (2013) fez um estudo analisando suínos de raça ibérica e javalis em Espanha, entre novembro de 2011 e abril de 2012. Na Tabela 1, observa-se as prevalências globais de parasitas em amostras de fezes *antemortem* recolhidas de 55 explorações de porco ibérico e em amostras de fezes *postmortem* de 100 porcos ibéricos.

Tabela 1: Prevalência global de parasitas em amostras fecais antemortem e postmortem recolhidas a porcos ibéricos

Parasita	Antemortem (55 explorações)	Postmortem (100 indivíduos)
<i>Balantidium coli</i>	94,5%	89,0%
Subordem Strongylida	65,5%	8,0%
Família Eimeriidae	56,4%	68,0%
<i>Metastrongylus</i> spp.	23,6%	25,0%
<i>Trichuris suis</i>	18,2%	24,0%
<i>Ascaris suum</i>	12,7%	8,0%

As amostras de fezes colhidas *postmortem* a partir de javalis foram divididas em três categorias: jovens (n=23 lotes), adultos (n=41 lotes) e sem informação sobre idade (n=14 lotes). Destes lotes, foram identificados vários parasitas, ilustradas na Tabela 2.

Tabela 2: Prevalência global de parasitas observados em amostras de fezes colhidas postmortem de javalis em lotes de jovens, adultos e sem informação sobre a idade.

Parasita	Jovens (23 lotes)	Adultos (41 lotes)	Sem informação sobre idade (100 indivíduos)
<i>Ascaris suum</i>	0,43%	12,2%	0%
Subordem Strongylida	34,8%	29,3%	0,7%
<i>Metastrongylus</i> spp.	0,87%	0,98%	0%
<i>Macracanthorhynchus hirudinaceus</i>	13%	0,24%	0,7%
<i>Balantidium coli</i>	78,3%	85,4%	0%
Família Eimeriidae	26,1%	1,5%	92,9%

García-González *et al.* (2013) analisaram 927 javalis no sudoeste de Espanha, durante as épocas venatórias 2004/2005 a 2008/2009. Os pulmões foram recolhidos para a observação de parasitas adultos de *Metastrongylus* spp., obtendo uma prevalência de 41,1%, em que o mais frequente foi o *M. apri* (71,4%), seguidamente *M. pudendotectus* (28,0%) e por último *M. salmi* (0,6%). Verificou-se que a prevalência foi maior em animais jovens (<1 ano), a intensidade da infeção foi maior em áreas de grande altitude (>451m) e com maior precipitação (>501 L/m²).

Na Galiza, noroeste de Espanha, foi feito um estudo abordando o javali como um reservatório secundário da *Fasciola hepatica*. Dos 358 fígados observados de javalis caçados, foi mostrado que 11,2% dos javalis encontravam-se infetados, com uma carga média de 2,3

parasitas adultos (min. 1 – máx. 14). Das amostras fecais dos animais parasitados (n=40), observou-se que 40,0% estavam parasitados com ovos de *F. hepatica*, com uma média de excreção de 6,1 ovos por grama (Mezo *et al.*, 2013).

Medne *et al.* (2009) analisaram vários animais (javalis, veados, gamos, muflões e faisões) que habitam em jardins de veados na Letónia (Kurzeme, Latgale, Vidzeme, Zemgale) de forma a determinar as infestações aí existentes. Em 2008, as 180 amostras fecais recolhidas de javalis foram analisadas, por meio de testes coprológicos, sendo que todos os javalis se encontravam parasitados. As prevalências dos parasitas encontrados no javali foram as seguintes: 84,0% para *Eimeria* spp.; 62,0% para estrongilídeos; 24,0% para *Strongyloides* spp.; 10,0% *Trichuris* spp.; 14,0% para *A. suum*.

Na Polónia, Popiolek, Knecht, Szczesna-Staskiewicz & Czerwińska-Rożalów (2010) compararam helmintes em dois grupos de javalis (silvestres e criados em cativeiro) no período entre a primavera de 2005 e o inverno de 2005/2006. Foram analisadas 142 amostras de fezes (61 das populações silvestres e 81 das populações em cativeiro), revelando a ocorrência de seis espécies de nemátodes. A prevalência da infeção de cada parasita foi: 84,5% para *Oesophagostomum* sp./*Globocephalus* sp.; 19% para *Ascarops strongylina*; 48,6% para *Metastrongylus* sp.; 13,4% para *T. suis*; 15,5% para *A. suum*; 2,8% para *Physocephalus sexalatus*. A prevalência global nos dois grupos foi similar, 98,4% em javalis silvestres e 96,3% em javalis de cativeiro, sendo que a média do número de ovos por grama foi mais elevado no grupo de javalis em cativeiro (46,6 OPG) comparativamente com o grupo de javalis silvestres (18,3 OPG). A frequência da taxa individual de helmintes mais significativa nos dois grupos foi na espécie *Oesophagostomum/Globocephalus* sp. e *Metastrongylus* sp. Estes apresentavam uma prevalência de 91,8% e 62%, respetivamente, referente ao grupo de javalis silvestres e *A. suum* apresentava uma prevalência de 25,9% relativo ao grupo de javalis, em cativeiro.

Num estudo realizado no Sul da Polónia, durante a época de Inverno 2009/2010, foram analisados 25 javalis através de necrópsia, verificou-se que 80% dos javalis encontravam-se parasitados. Dos 1695 nemátodes pulmonares, foram identificados 66,1%, tendo sido observado 5 espécies de *Metastrongylus* com as respetivas prevalências: *M. pudendotectus* (34,7%), *M. salmi* (28,2%), *M. asymmetricus* (15,7%), *M. elongatus* (11,1%) e *M. confusus* (10,3%) (Nosal *et al.*, 2010).

Rajkovic-Janje *et al.* (2002) estudaram a fauna helmíntica de 47 javalis caçados no este da Eslovénia, Croácia, entre novembro de 2000 e o final de janeiro de 2001. Os animais tinham idades compreendidas entre 1 e 6 anos e encontravam-se em boa condição física. O exame aos órgãos (esófago, pulmões, estômago, intestino delgado e grosso) revelou a presença de 14 espécies de helmintes: 10 nemátodes, 1 acantocéfalo, 1 tremátode e 2 céstodes. Os helmintes encontrados com as devidas prevalências foram: *Gongylonema pudendotectus* (27,7%), *P. sexalatus* (25,5%), *A. strongylina* (57,5%), *Hyostrongylus rubidus* (2,1%),

Gnathostoma hispidum (6,4%), *Globocephalus urosubulatus* (93,6%), *Oesophagostomum dentatum* (2,1%), *Trichinella* sp. (4,3%), *M. apri* (66,7%), *M. pudendotectus* (80,9%), *Macracanthorhynchus* (2,1%), *Echinochasmus perfoliatus* (12,8%), *Echinococcus hydatidosus* (4,3%) e *Cysticercus tenuicollis* (8,5%).

2.4.1.2 Médio Oriente

Num estudo efetuado na Turquia, durante o ano de 2007 a 2008, foram submetidos a necrópsia 27 javalis. Destes, 20 (74%) encontravam-se parasitados, tendo sido identificadas 11 espécies de helmintes com as seguintes prevalências: *M. apri* (59%), *M. salmi* (52%), *M. pudendotectus* (52%), *Dicrocoelium dendriticum* (33%), *G. urosubulatus* (22%), *Macracanthorhynchus hirudinaceus* (19%), *G. pulchrum* (11%), *P. sexalatus* (7%), *T. suis* (7%), *A. strongylina* (4%), *H. rubidus* (4%) e *Taenia hydatigena larvae* (4%). Este estudo foi o primeiro a descrever a presença de *G. urosubulatus*, *M. hirudicaneus*, *P. sexalatus*, *A. strongylina* e *H. rubidus*, *M. salmi*, *M. pudendotectus*, *D. dendriticum*, em javalis residentes na Turquia (Senlik, Cirak, Girisgin & Akyol, 2011).

No Médio Oriente, foi realizado um estudo com o objetivo de caracterizar as infeções helmínticas em javalis caçados no norte do Irão, durante o mês de novembro de 2013. Foram identificadas sete espécies de helmintes nos javalis necropsiados, com as seguintes prevalências: *D. dendriticum* (22%), *M. hirudinaceus* (19%) *P. sexalatus* (7%), *M. apri* (34%) *G. pulchrum* (9%), *T. suis* (6%) e *T. hydatigena larvae* (3%); sendo que as quatro primeiras espécies foram reportadas pela primeira vez nesta região (Yagoob, Saeed, & Ali, 2014).

2.4.1.3 Ásia

No sul da Índia, foi efetuado um estudo em 2013 sobre a fauna helmíntica de porcos silvestres (*S. scrofa*) que interferiam com a agricultura e que se encontravam muito próximos de habitações. Foram analisadas 30 amostras fecais (10 em cada região estudada – Ooty, Pollachi e Sathyamangalam), observando-se uma prevalência global de parasitas, nas 3 regiões do sul da Índia, de 100%, 92,5% e 90%, respetivamente. Os parasitas assinalados, com as seguintes prevalências para as 3 regiões foram, respetivamente: *A. suum* (80%, 80%, 70%); *T. suis* (60%, 70%, 80%); estrongilídeos (70%, 60%, 70%); *Strongyloides* sp. (70%, 60%, 50%). Globalmente, ainda foram identificadas infeções mistas de *Ascaris* e *Trichuris* com uma prevalência média de 70%, e de estrongilídeos e *Strongyloides* sp., com uma prevalência média de 30%. As técnicas utilizadas foram: a técnica de sedimentação com centrifugação e flutuação (Allwin, Jayathangaraj, Palanivelrajan & Raman, 2015).

Num estudo realizado na região oeste de Tokyo, em 2001, foram analisadas 42 amostras de pulmões verificando que todos os javalis japoneses (*Sus scrofa leucomystax*) se encontravam parasitados por nemátodes pulmonares com 2 ou mais espécies. Foram identificadas quatro espécies do género *Metastrongylus*: *M. elongatus*, *M. salmi*, *M. asymmetricus* e *M.*

pudendotectus com as respetivas prevalências: 92,9%, 100%, 88,1% e 71,4%, respetivamente (Morita *et al.*, 2007).

2.4.1.4 América

No sul do Brasil, foi feito um estudo por Silva & Müller (2013) com o objetivo de identificar helmintes do sistema digestivo em explorações de javalis. Foram recolhidos tubos digestivos de 40 animais durante o seu abate em câmara fria, entre agosto de 2010 e maio de 2011. Dos 40 animais analisados 87,5% encontravam-se parasitados por 4 espécies de helmintes. As espécies com maior prevalência encontradas foram as seguintes: a *T. suis* (67,5%); seguido de *Trichostrongylus colubriformis* (45%), de *A. suum* de forma imatura (42,5%), de *A. suum* de forma adulta (12,5%) e de *Oesophagostomum dentatum* (5%). Foi demonstrado que *T. colubriformis* apesar de adquirir capacidade de se desenvolver no intestino delgado, também se adapta a javalis criados em cativeiro, podendo ser uma das causas de perdas económicas nas explorações.

Na Jamaica, foram analisados 31 javalis silvestres entre junho de 2004 e agosto de 2006. Nas necrópsias realizadas foram identificadas 4 espécies de helmintes adultos com as seguintes prevalências: *H. rubidus* (77%), *M. hirudinaceus* (77%), *G. urosubulatus* (48%) e *O. dentatum* (42%). Concluiu-se que não houve qualquer associação entre os helmintes encontrados e o sexo do hospedeiro. Contudo, houve uma associação positiva entre a prevalência de *G. urosubulatus* e a idade do hospedeiro (Okoro., Wilson, Lorenzo-Morales & Robinson, 2015).

2.4.2 Em Portugal

Em Portugal, um estudo realizado na região de Trás-os-Montes e Alto Douro, entre setembro de 2011 e fevereiro de 2012, teve como objetivo a identificação dos principais endoparasitas, em 57 amostras fecais de javalis, caçados em montarias (Duarte *et al.*, 2014). Destas amostras, 29,8% (17 amostras) encontravam-se parasitadas, sendo possível identificar o género *Metastrongylus* em 58,8% e *A. suum* em 29,4% das amostras positivas. Em relação aos protozoários, foram encontrados quistos de *Balantidium* sp. em 2 amostras (3,5%); oocistos de *Cryptosporidium* sp. em 4 amostras (7%) e quistos de *Giardia* em 2 amostras (3,5%), identificados através da técnica de imunofluorescência (Duarte *et al.*, 2014).

Os javalis da Tapada Nacional de Mafra (TNM) são muitas vezes objeto de estudo. Durante a época venatória de abril de 2000 a julho de 2001, Bruno de Sousa (2003) analisou 23 fígados, 19 pulmões de javalis, 8 tubos digestivos e 6 amostras fecais de javalis caçados. Nos fígados foi encontrado *Fasciola hepatica* em 60,9% e *Cysticercus tenuicollis* num deles (4,3%). Nos pulmões observou-se o género *Metastrongylus* spp. com uma prevalência de 42,1%, tendo sido reportado, pela primeira vez em Portugal, a espécie *Metastrongylus apri* neste ungulado. Relativamente ao trato digestivo, foram identificadas 4 espécies de nemátodes com as respetivas prevalências: *G. urosubulatus* (62,5%), *O. dentatum* (25%), *A. strongylina* (12,5%)

e *T. suis* (12,5%). Das amostras de fezes observadas, foram identificados ovos de strongilídeos, com uma média de 2142 OPG e uma prevalência de nemátodes gastrointestinais de 61,1%. A prevalência global foi de 78,2% dos javalis estudados (Bruno de Sousa, Madeira de Carvalho, Fazendeiro, Castro Rego & Afonso-Roque, 2004).

Santos (2013) fez um estudo na TNM durante um ano, onde recolheu amostras de fezes em 3 populações de javalis e realizou necrópsias a 9 capturados para avaliação parasitológica. Através das técnicas coprológicas, verificou-se que todas as populações de javalis se encontravam parasitadas. Pela técnica de McMaster foi registado uma média de 4243 OPG, 1488 OPG e 1513 OPG, respetivamente, para a primeira, a segunda e a terceira população. Os oocistos não esporulados do género *Eimeria* foram observados em 46,7% das amostras. Também foram identificadas larvas L3, correspondentes ao género *Oesophagostomum* e ao género *Hyostrogylus*. Em dezembro de 2011, uma maior prevalência para *Oesophagostomum* com 87% e menor para o género *Hyostrogylus* com 13%, e em janeiro de 2012, com valores bem distintos, 7% e 93 %, respetivamente. Quanto aos parasitas hepáticos, *F. hepatica* foi identificado através de duas técnicas: técnica de sedimentação simples e McMaster modificado, sendo que todas as populações obtiveram pelo menos 50% de amostras positivas. Na primeira população 85,7% e 100%, respetivamente, na segunda população 50%, em cada técnica utilizada, e na terceira população 100% nas duas técnicas. Foi observado, ainda, a presença de ovos de *Trichuris* sp. nas duas populações, *Physocephalus* spp. nas três populações e o único nemátode pulmonar encontrado foi o género *Metastrongylus*. Relativamente aos parasitas adultos do trato gastrointestinal dos 9 javalis capturados, 3 animais (33,3%) encontravam-se parasitados, sendo que 100% dos parasitas encontrados eram da espécie *A. strongylina* e 12,5% do género *Oesophagostomum*. Na pesquisa de nemátodes pulmonares adultos, verificou-se que 55,6% das amostras estavam infetadas, em que nestas amostras se identificaram 3 espécies, com a maior prevalência para a espécie *M. salmi* (44,44%), seguida de *M. pudentotectus* (11,11%) e *M. elongatus* (11,11%). No que diz respeito aos parasitas hepáticos adultos, 5 animais (55,56%) estavam parasitados por *F. hepatica*. Na coprologia de animais caçados, todos se encontravam parasitados. A contagem média de OPG foi de 6738 ± 7590 OPG (min. 550 – máx. 25750), com uma média de OPG superior nos machos (8592 OPG) comparando com as fêmeas (1175 OPG). Em relação às larvas infetantes L3, as de *Oesophagostomum* sp. eram predominantes relativamente às de *Hyostrogylus* sp. Através da técnica de sedimentação, apenas um animal foi positivo (12,5%), mas utilizando a técnica de McMaster modificado 87,5% foram positivos, e verificou-se uma média de 39 ± 21 OPG para a *F. hepatica*, com uma prevalência de adultos de 55,6%.

No Alentejo, mais propriamente na região de Évora, realizou-se um estudo em 24 explorações de suínos de raça alentejana de produção extensiva, entre março de 2008 e fevereiro de 2009, que tinham contacto constante com javalis silvestres. As amostras de fezes analisadas

encontravam-se quase 80% parasitadas, com as seguintes espécies e as respetivas prevalências: *Oesophagostomum* spp./*H. rubidus* (79%), *P. sexalatus* (25%), *Trichostrongylus* spp. (4%), *A. suum* (25%), *Strongyloides ransomi* (29%), *Globocephalus urosubulatus* (42%) e *T. suis* (17%), *Metastrongylus* spp. (29%), *Eimeria* spp. (79%), *Isospora suis* (58%) e *B. coli* (67%). Dos 3 grupos em estudo (recrta, engorda e reprodutores) o primeiro foi o que representou maior prevalência e diversidade de parasitas (Gomes, 2009).

Um estudo, feito no Norte Transmontano, Alto Douro, concelho de Lousã e na Companhia das Lezírias, analisou amostras fecais de 121 javalis de novembro de 2008 a fevereiro de 2009. Das 100 técnicas de McMaster detetou-se *Ascaris* spp. (1%) e *Trichuris* spp. (2%) e *Metastrongylus* spp. (9%). Através da técnica de flutuação, nas 61 amostras analisadas observaram-se ovos de *Ascaris* spp. (1%), *Trichuris* spp. (2%) e *Metastrongylus* spp. (5%) Através das 72 técnicas de Baermann realizadas observou-se que todas as amostras foram negativas. Relativamente a protozoários, assinalou-se a presença do género *Eimeria*, com uma prevalência de 2% nas 100 amostras estudadas e os animais infetados eram na sua globalidade fêmeas gestantes. O parasita mais prevalente foi o género *Metastrongylus* com 12% de prevalência (Calado, 2009).

2.5 Parasitas do veado no mundo e em Portugal

2.5.1 No mundo

2.5.1.1 Europa

Em Toledo e Cáceres, no centro de Espanha, foi realizado um estudo, com o objetivo de caracterizar os parasitas gastrointestinais de cervídeos (Santín-Durán, Alunda, Hoberg & de la Fuente, 2004). Em Quintos de Mora (Toledo), foram recolhidos um total de 147 veados e analisados parasitas que estavam presentes em 81 veados adultos (39 machos e 42 fêmeas) entre outubro de 1994 e setembro de 1995. Nas duas localidades de Cáceres, em Maluéniz de Arriba, recolheram-se 55 veados adultos (22 machos e 33 fêmeas) e em La Herguijuela recolheram-se 13 machos adultos durante o outono de 1999. Na Quintos de Mora, os nemátodes foram encontrados em 97,5% (81 animais) dos abomasos analisados, que pertenciam a quatro espécies, com as seguintes prevalências: 96,3% (78 animais) para *Spiculopteragia asymmetrical*/*S. quadrispiculata*; 67,9% (55 animais) para *Ostertagia leptospicularis*/*O. kolchida*; 33,3% (27 animais) para *Ostertagia drozdzi*/*O. ryjkovi* e apenas dois animais com *Trichostrongylus axei*. Em Maluéniz de Arriba, os nemátodes adultos foram encontrados em 98,1% dos animais, tendo sido identificadas 4 espécies: *S. asymmetrical*/*S. quadrispiculata* (98,1%); *O. leptospicularis*/*O. kolchida* (61,54%) em que a prevalência nos veados machos foi significativamente mais elevada do que nas fêmeas; ainda foi observado

a espécie *O. drozdzi/O. ryjkovi* (7,69%) em machos, e finalmente *T. axei* (17,31%). Na região de La Herguiejuela, todos os veados se encontravam parasitados, e foi possível identificar duas espécies: *S. asymmetrical/S. quadrispiculata* com 100% de prevalência e *O. leptospicularis/O. kolchida* com 7,69% (Santín-Durán *et al.*, 2004).

Em 2008, o autor do estudo anterior analisou a dinâmica sazonal de helmintes abomasais e a sua distribuição por idade em veados do centro de Espanha (Santín-Durán, Alunda, Hoberg, & de la Fuente, 2008). A área de estudo localizou-se em Quintos de Mora (Toledo), onde foram caçados e necropsiados 141 veados, no período de outubro de 1994 a fevereiro de 1995. De seguida, os animais foram repartidos em três grupos: jovens (<1 ano), subadultos (1 a 2 anos) e adultos (>2 anos). Dos 141 animais, 131 (92,9%) encontravam-se parasitados e foi possível identificar parasitas com as seguintes prevalências: *Spiculopteragia asymmetrical/S. quadrispiculata* (92,2%), *Ostertagia leptospicularis/O. kolchida* presente em 99 veados (70,2%), onde os jovens mostraram ter níveis baixos de infeção, e finalmente *Ostertagia drozdzi/O. ryjkovi* (44,7%) em que os adultos mostraram ter uma baixa prevalência (Santín-Durán *et al.*, 2008). Na Polónia, foi efetuado um estudo de forma a descrever as infeções parasitárias em veados que habitam no Sul, na região de Cracóvia. Foram analisados seis animais, onde cinco eram provenientes de uma área de caça e um de zona urbana, em 2011-2012. Nestes animais realizaram-se necrópsias, análises coprológicas e coproculturas para determinar as espécies de *Eimeria*. Na necrópsia foram identificados os seguintes parasitas: *Ashworthius sidemi* em todos os animais, *Spiculopteragia spiculoptera* e *Oesophagostomum sikae* em dois animais e *O. venulosum* num animal. Nas análises coprológicas observaram-se ovos da subordem Strongylida e oocistos de *Eimeria* spp. em dois animais (33,3%), com 120 OPG e 20 OoPG (oocistos por grama). Com a esporulação identificaram-se duas espécies de *Eimeria*: *E. elaphi* e *E. austriaca*. Os resultados demonstraram que o veado é um possível transmissor de *A. sidemi* para outros ungulados da região (Kowal *et al.*, 2014).

Em 2000, foi realizado um estudo na região de Toledo e Ciudad Real, Espanha, com o objetivo de caracterizar parasitas de 239 veados. As amostras foram recolhidas durante as épocas cinegéticas de 1997 a 1999 e os animais caçados foram submetidos a exame externo para visualização de ectoparasitas, e necrópsia para identificação de endoparasitas. Contabilizaram-se 16 espécies de nemátodes: *Cooperia pectinata*, *Cooperia punctata* com uma prevalência de 3% para estas duas espécies, *Dictyocaulus viviparus* (2%), *Elaeophora elaphi* (23%), *Gongylonema pulchrum* (26%), *Oesophagostomum radiatum* (3%), *Oesophagostomum venulosum* (80%), *Ostertagia kolchida* (5%), *Ostertagia leptospicularis* (26%), *Ostertagia lyrata* (63%), *Ostertaria ostertagi* (22%), *Spiculopteragia asymmetrical* (78%), *T. axei*, *Trichuris skrjabini* (4%) e o género *Capillaria* sp. (3%); um cestode *Moniezia benedeni* (<1%) e um acantocéfalo *M. hirudinaceus*. Dos animais estudados, 99% estavam infetados

por helmintes gastrointestinais, particularmente da subfamília *Ostertagiinae* com 87% de prevalência (García-Romero, Valcárcel, Corchero, Olmeda & Pérez-Jiménez, 2000).

Em Castilla-La Mancha, centro de Espanha, foram analisados tratos gastrointestinais de 196 veados, com o objetivo de conhecer as parasitoses gastrointestinais. As amostras foram recolhidas em três províncias: Toledo, Ciudad Real e Cuenca, entre dezembro de 1994 e dezembro de 2000. Verificou-se que o abomaso e o ceco foram as partes mais afetadas, com uma prevalência de 78,4% e 70,4%, respetivamente. As espécies de nemátodes identificadas com as seguintes prevalências foram: *Spiculoteragia asymmetrica* com 68,9%; nemátodes do tipo *Ostertagia* com 67,3%; *Ostertagia lyrata* com 45,4%; *O. leptospicularis* com 23%; *O. ostertagi* com 20,1%; *O. kolchida* com 6,6%; *Trichuris* spp. com 11%; *T. ovis* com 4,6%; *T. skrjabini* com 2%; *T. globulosa* com 1%; *Capillaria* com 8,7%; *Trichostrongylus* sp. com 3,6%; *Cooperia* sp. com 2% e *Nematodirus* sp. com 0,5% (Valcárcel, Corchero, Olmeda, Rojo Vázquez & García Romero, 2002).

Ramajo Martín, Pérez Sánchez, Ramajo Hernández e Oleaga (2007) observaram fezes e cadáveres de 38 cervídeos e bovinos silvestres da Reserva Nacional das Batuecas e de montados privados, localizados na província de Salamanca. Os parasitas observados nos 8 veados foram: do reino Protozoa - *Sarcocystis* spp. (50%), *Eimeria* spp. (13%), *Cryptosporidium* spp. (13%); helmintes da classe Trematoda – *D. dendriticum* (25%) e *Paramphistomum cervi* (50%); da classe Cestoda – *M. benedeni* (38%); e do filo Nematoda - *Elaphostrongylus cervi* (75%), *Protostrongylus/Muellerius*, *Ostertagia* spp. (63%), *Teladorsagia circumcincta* (50%), *Trichostrongylus axei* (50%), *Nematodirus spathiger* (13%), *Capillaria* sp. (13%) e *Trichuris ovis* (13%). Todos os animais avaliados estavam parasitados, pelo menos, por uma espécie.

Na Noruega, foram estudados 13 veados de uma população isolada, que não tinham contato com outros ruminantes e apresentavam uma alta densidade populacional (37-43 veados/km²), tendo-se estimado a existência de cerca 110–130 indivíduos antes do abate, em dezembro de 2006. O estudo teve como objetivo caracterizar parasitas gastrointestinais, pela visualização do trato gastrointestinal de 13 animais abatidos, entre 6 e 10 de fevereiro de 2007. Desta forma, foi possível identificar parasitas provenientes de 12 abomasos (91,7% positivos) e de 13 intestinos delgado (38,5%) e grosso (30,8%). As espécies detetadas apresentavam as seguintes prevalências: *Ostertagia leptospicularis* com 83% (n=10), *O. kolchida* com 33% (n=4), *Spiculopteragia spiculoptera* com 92% (n=11), *S. mathevossiani* com 17% (n=2), *T. axei* com 42% (n=5) e *Capillaria bovis*, *Cooperia oncophora*, *Trichuris globulosa*, *Oesophagostomum venulosum* com 15% cada (n=2) (Davidson, Kutz, Madslien, Hoberg & Handeland, 2014).

Na Letónia, foi efetuado um estudo epidemiológico de forma a determinar as parasitoses de animais que habitam em parques de cervídeos (Medne *et al.*, 2009). As 487 amostras fecais de veados foram recolhidas em 2008 para análises coprológicas. Estas análises resultaram

na observação de diversos parasitas, com as seguintes prevalências, nos quatro locais: *Eimeria* spp. com 2-10,7%; *Dictyocaulus* spp. com 2,3-52,9%; *Protostrongylus* spp. com 20-59,5%; estrongilídeos gastrointestinais com 29,2-84,3%; *Strongyloides* spp. com 14,9-16,2%; *Trichuris* spp. com 6,1-50,0%; *F. hepatica* com 2,0-3,0%; *Paramphistomum* spp. com 1,1-2,6%; *Moniezia* spp. com 3,3-3,8%. A prevalência global para os veados foi de 73,3% (Medne *et al.*, 2009).

Kusak *et al.* (2012) determinaram o estado geral das principais presas de lobo (*Canis lupus*) e lince euroasiático (*Lynx lynx*) residentes na Croácia, analisando 41 veados e 25 corços com um total de 66 cervídeos, que foram caçados em duas áreas de caça, durante a época venatória de 2007. Destes 41 veados recolheu-se 472 amostras para pesquisa de parasitas, análise de infecções bacterianas não específicas e três específicas. Nos testes não específicos, observou-se a presença de *Streptococcus* sp., já nos testes específicos, os resultados foram negativos à pesquisa de *Mycobacterium* sp., *Brucella* sp. e *Leptospira* sp. (Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas [ICNF]). Os endoparasitas identificados com as respetivas prevalências foram: *Dictyocaulus* spp. (29,3%), *Ostertagia* spp. (17,1%) e *E. cervi* (14,6%), *Oesophagostomum* sp. e *Trichostrongylus* sp. com 7,3% cada; *Protostrongylus* sp., *Ostertagia trifurcata*, *Ostertagia circumcincta*; *Trichostrongylus vitrinus*, *Trichuris* sp. e *Eimeria* spp. com 2,4% cada. Neste estudo, constatou-se que a baixa prevalência de infecções parasitárias e a ausência de infecções bacterianas deveram-se às condições do habitat onde vivem, à baixa densidade de veados, à ausência de animais domésticos e à presença de grandes carnívoros que eliminam veados enfraquecidos por doença.

Em Itália, as larvas de protostrongilídeos foram pesquisadas numa população selvagem de veados na província de Bologna e Pistoia de outubro de 2001 a janeiro de 2002. Dos 68 animais, 41% encontravam-se parasitados (20 eram adultos, 4 subadultos e 4 jovens) nas fezes, pulmões e linfonodos ilíacos e inguinais. Os parasitas encontrados eram consistentes com a espécie *E. cervi*, que foi reportada pela primeira vez neste país (Morandi *et al.*, 2006). Um estudo feito na Bulgária, teve como objetivo conhecer aspetos etiopatológicos de infecções de *E. cervi* e *Varestrongylus sagittatus* em veados. As 110 amostras fecais e os cinco pulmões de veados entre os 2 e 8 anos, foram colhidas de 2005 a 2008. Foram observados protostrongilídeos em 77 amostras (70%), com uma prevalência de 68% para *E. cervi* e 27% para *V. sagittatus*. Também se observaram infecções mistas em 28 amostras fecais (25%) e em todas as amostras de pulmões (Panayotova-Pencheva & Alexandrov, 2011).

2.5.2 Em Portugal

Em Portugal, Maia (2001) caracterizou a fauna helmíntica de veados e gamos que coabitam na Tapada Nacional de Mafra. De setembro de 1992 a março de 1993 foram recolhidos aparelhos gastrointestinais de 12 veados e 13 gamos. Nos veados foram observadas 4 espécies: *Fasciola hepatica*, *Cysticercus tenuicollis*, *Oesophagostomum venulosum* e *Haemonchus contortus* tendo, cada uma delas, e respetivamente, uma prevalência de 33,4%; 8%; 25% e 8%. A recolha de amostras de fezes em zonas e altitudes diferentes na Tapada ocorreu entre 6 e 12 de outubro de 1992. Os resultados revelaram a presença de ovos de strongilídeos gastrointestinais, de *Trichuris* sp., de *Capillaria* sp. e de *Strongyloides* sp. com uma baixa excreção de ovos (min. 100 OPG - máx. 300 OPG) (Maia, 2001).

Um estudo realizado no sul de Portugal teve como o objetivo, determinar a prevalência de *Elaphostrongylus cervi* em veados, provenientes da Herdade da Contenda, localizada no Alentejo. As 29 amostras de fezes, 24 pulmões e 17 exsudados pulmonares foram recolhidas em 29 veados adultos. Das amostras fecais analisadas 72% continham larvas no 1º estadio (L1) e com espinha dorsal. Já nos exsudados pulmonares, as larvas L1 foram encontradas em 47% das amostras e a média das L1 presentes nas fezes foi de 263L1/g (15-1445 L1/g). Este estudo relatou pela primeira vez a existência deste nemátode pulmonar em Portugal (Bruno de Sousa *et al.*, 2014).

Santos (2013) fez um estudo em animais que coabitam na Tapada Nacional de Mafra, Portugal. Para isso, recolheu amostras de fezes, mensalmente, de uma população de veados, sete de gamos e três de javalis, durante um ano. Também acompanhou o ato venatório de gamos, javalis e veados. Relativamente, às amostras fecais dos veados, a média de ovos por grama (OPG) de fezes foi de 36,4 OPG, em que, durante três meses, os ovos eram de tricurídeos. A técnica de Willis revelou que 72,7% das amostras foram positivas. As larvas L3 encontradas eram do género *Oesophagostomum* e do género *Ostertagia*. Com técnica de sedimentação simples e de McMaster modificado, utilizados para observar a presença de *F. hepatica*, obteve-se uma prevalência de 9,1% e 10%, respetivamente. Através da técnica de Baermann, detetou-se a presença de ovos de *Trichuris* sp. e *Capillaria* sp. e com coprocultura em copo observou-se o predomínio repartido pelo género *Oesophagostomum* e *Ostertagia*. *Cryptosporidium* spp. foi identificado em 9,1% dos esfregaços fecais. Os parasitas do género *Muellerius*, *Protostrongylus* e *Dictyocaulus* foram os parasitas pulmonares observados neste estudo. No veado capturado, a nível do intestino grosso, observou-se a presença de dois parasitas adultos do género *Trichuris*. A coprologia exibiu 150 OPG pela técnica de McMaster e o resultado da coprocultura em copo foi de 0,5 L3/g, com uma percentagem de desenvolvimento larvar de 0,33% e observação do género *Cooperia* e *Ostertagia*.

2.6 Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

A tuberculose bovina (TB) é uma doença crónica e progressiva, tendo como agente etiológico a espécie *Mycobacterium bovis*, podendo estar envolvida também a espécie *Mycobacterium caprae*. Ambos fazem parte do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) que contribui para a tuberculose nos mamíferos (Risco *et al.*, 2014). O CMT é composto por sete espécies do género *Mycobacterium*: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii* e *M. canettii*. Esta doença afeta principalmente bovinos, mas também infecta outras espécies domésticas, silváticas e o Homem. (de Lisle, Bengis, Schmitt & O'Brien, 2002; Raposo, 2011). A excreção é feita pelo ar expirado, secreções respiratórias e fezes. Menos frequentemente, a micobactéria pode ser expelida pelo leite, urina, abscessos ou lesões abertas de gânglios periféricos. As vias de transmissão podem ser diretas ou indiretas. A transmissão direta ocorre quando há contato entre o hospedeiro infetado e o hospedeiro suscetível e, indiretamente, a transmissão é feita pela contaminação do ambiente por meio de produtos virulentos. As vias de transmissão mais frequentes são a via aerógena (inalação de aerossóis), seguindo-se a via oral, como por exemplo a ingestão de leite, água ou pasto (Gortazar *et al.* 2005; Naranjo, Gortazar, Vicente & de la Fuente, 2008).

A infeção de espécies silvestres com *M. bovis* tem contribuído para o atraso nos programas de erradicação da doença, em bovinos, em alguns países. Inúmeras espécies silvestres podem ser infetadas, mas nalguns casos não contribuem para a persistência da doença, caso do javali na Austrália, onde é considerado hospedeiro acidental ou fundo de saco (Nugent, 2011). Por outro lado, noutras partes do globo, existem pequenos grupos de espécies capazes de contribuir, independentemente ou em conjunto, para a persistência da TB, sendo exemplo a combinação do javali e veado em Espanha (Gortazar *et al.*, 2005) e em Portugal (Santos, Almeida, Gortázar & Correia-Neves, 2015). Desta forma, existem países que têm sofrido um ressurgimento da doença pela existência de espécies silváticas reservatórios, como é o caso do búfalo africano (*Syncerus caffer*) na África do Sul; o bisonte canadiano (*Bison bison*) e o veado (*Cervus elaphus*) no Canadá; o texugo europeu (*Meles meles*) no Reino Unido e Irlanda; o possum (*Trichosurus vulpecula*) na Nova Zelândia ou do veado-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) nos Estados Unidos da América e, finalmente, o javali (*Sus scrofa*) a nível europeu (de Lisle *et al.*, 2002; Naranjo *et al.*, 2008).

Em Portugal, a prevalência de tuberculose bovina em bovinos e a ocorrência da doença em javalis, estão significativamente associadas, sugerindo uma relação entre a doença nestas espécies. Para além disso, a presença de tuberculose bovina em javalis está também, significativamente associada com a densidade e diversidade de ungulados silvestres, como é o caso do veado. Assim, o javali parece ser hospedeiro de manutenção de *M. bovis* em Portugal, e preenche as condições teóricas para poder ser considerado reservatório de tuberculose bovina no nosso país (Santos *et al.*, 2009).

As espécies reservatórios da TB são hospedeiros de manutenção, que mantêm a infecção numa área, sem que haja transmissão cruzada, a partir de outras espécies de animais domésticos ou selvagens (Naranjo *et al.*, 2008). A transmissão depende da prevalência da TB na população do reservatório silvestre e das suas relações no ecossistema (de Lisle *et al.*, 2002). Por isso é importante agir, também, nestas espécies.

Nas espécies silváticas, a detecção de tuberculose bovina é realizada por exame *postmortem* e suportado por testes histopatológicos e bacteriológicos. O javali desenvolve lesões nos linfonodos submandibulares e torácicos, sendo comum a presença de lesões generalizadas e de grandes dimensões (Santos, 2007; Naranjo *et al.*, 2008). Nos veados, as lesões localizam-se a nível pulmonar e dos linfonodos retrofaríngeos, desenvolvendo granulomas com numerosos bacilos (Martín-Hernando *et al.*, 2010).

2.6.1 Interação entre macroparasitas e microparasitas

Na natureza, as coinfeções (infecções causadas por dois ou mais espécies de parasitas num hospedeiro) são ubíquas (Ezenwa & Jolles, 2011; Risco *et al.*, 2014).

Inúmeros estudos têm investigado o impacto de uma espécie de parasita, a nível da sua sobrevivência e reprodução no hospedeiro e seu ciclo de vida livre (Bordes & Morand, 2011). Contudo, com o ressurgimento de doenças infecciosas emergentes (DIE), alguns cientistas têm vindo a incorporar, nos seus estudos, o impacto das interações entre macroparasitas (ex.: helmintes) e microparasitas (ex.: vírus, bactérias, protozoários) no hospedeiro (Jolles, Ezenwa, Etienne, Turner & Olff, 2008; Risco *et al.*, 2014).

De todas as possíveis interações, a coinfeção entre helminte-bactéria é um dos modelos mais estudados (Bordes & Morand, 2011; Risco *et al.*, 2014). Apesar das interações macroparásita-microparásita estarem bem ilustradas, caso das coinfeções entre helminte-tuberculose, helminte-HIV (vírus da imunodeficiência humana) ou helminte-malária nos humanos (Bentwich *et al.*, 1999; Druilhe *et al.* 2005), a sua relevância na dinâmica da doença continua a ser pobremente conhecida (Ezenwa & Jolles, 2011). Os helmintes são os parasitas mais comuns nos animais selvagens, podendo desempenhar um vasto papel, na formação de padrões emergentes da doença em populações (Ezenwa, Etienne, Luikart, Beja-Pereira & Jolles, 2010).

A competição entre dois ou mais agentes pode ser direta ou indireta, através da competição de recursos (ex.: sangue) e do sistema imunitário (imunossupressão ou imunomodulação). Nas coinfeções, o peso de um ou mais parasitas pode ser reforçado pela presença de outro ou, pelo contrário, ser suprimido (Bordes & Morand, 2011). Mas, na grande maioria destas coinfeções é difícil distinguir que agente causa efeito no outro.

Na interação helminte-microparásita, os helmintes podem alterar a eficiência do sistema imunitário do hospedeiro. O linfócito T *helper* tipo 1 (Th1) produz moléculas mensageiras (citoquinas) que têm um papel chave na amplificação de mecanismos de resposta imunitária

diretamente contra microparasitas (agentes patogénicos intracelulares), enquanto o linfócito T *helpertipo* 2 (Th2) produz citocinas que promovem mecanismos dirigidos a macroparasitas, como é o caso dos helmintes (Ezenwa & Jolles, 2011).

Sucedem que, estas citocinas também têm um papel imunorregulador. Por um lado, a resposta imunitária mediada por linfócitos Th2 (imunidade humoral) é efetuada por citocinas, tais como as interleucinas (IL)-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que estimulam os linfócitos B a produzirem anticorpos e eosinófilos contra helmintes. Por outro lado, as mesmas citocinas suprimem as citocinas dos linfócitos Th1. A resposta imunitária mediada por Th1 (imunidade celular) é composta por citocinas como interferão (IFN)- γ , IL-12 e fator necrose tumoral (TNF)- α que estimulam linfócitos T citotóxicos e macrófagos na destruição de agentes patogénicos intracelulares (Bordes & Morand, 2011; Jolles *et al.*, 2008). Contudo, existem alguns helmintes que apesar de suprimirem a imunidade celular, também inibem a imunidade humoral do hospedeiro, através da ativação de linfócitos T reguladores que estimulam a libertação de citocinas reguladoras, como o fator de crescimento (TGF)- β e o IL-10 (Maizels *et al.*, 2004).

Roepstorff, Mejer, Nejsun e Thamsborg (2011) analisaram explorações de porcos de produção intensiva e extensiva, após novas regras legislativas sobre bem-estar animal na Dinamarca, e a importância da relação entre hospedeiro-parasita de três espécies de helmintes: *A. suum*, *T. suis* e *Oesophagostomum* sp.. Os parasitas *A. suum* e *T. suis* são parasitas com alta imunogenicidade (capacidade antigénica de desencadear uma resposta imunitária no hospedeiro), enquanto *Oesophagostomum* sp. apresenta uma baixa imunogenicidade (Nansen & Roepstorff, 1999). O *Oesophagostomum* sp. consegue persistir no suíno durante anos, aparentemente, porque a estimulação das células Th2 é realizada, mas a resposta é retardada (Andreasen *et al.*, 2014; Maizels *et al.*, 2004).

Andreasen *et al.* (2014) analisaram 48 porcos cruzados de Landrace/Yorkshire/Duroc que foram inoculados com duas espécies de parasitas, *T. suis* e *O. dentatum*, de forma a analisar as interações imunológicas de coinfeções helmínticas. Neste estudo, verificou-se que a presença de *T. suis* teve uma influência negativa na coinfeção com *O. dentatum*, enquanto este último mostrou ter uma influência positiva na população de *T. suis*, observando-se mais larvas e uma expulsão tardia. Os anticorpos anti-*Oesophagostomum* spp. foram mais estimulados no grupo de porcos coinfectados do que em porcos infectados só por *O. dentatum*. O estudo indicou que *Oesophagostomum* sp., por demonstrar capacidade de modelar o sistema imunitário do hospedeiro, aumenta a sua sobrevivência com mais eficiência do que *T. suis*.

Os efeitos das infeções helmínticas, em animais selvagens infectados por *M. bovis*, foram abordados em alguns estudos. Ezenwa *et al.* (2010) observaram as interações de nemátodes gastrointestinais em búfalos africanos (*Syncerus caffer*) infectados com TB, que habitavam num parque natural da África do Sul, através da contagem de ovos de nemátodes da subordem Strongylida, técnica de McMaster e níveis basais de INF- γ sanguíneas. Para o

efeito, capturou 541 animais, durante duas semanas do mês de outubro de 2005 (época seca) e do mês de maio de 2006 (época húmida). Os búfalos com mais OPG tinham um nível basal de IFN- γ mais elevado e o tratamento antihelmíntico que foi feito, aumentou os níveis de produção desta. A contagem de OPG foi negativamente relacionada com eosinófilos, que é uma primeira resposta efetuada na resposta imunitária mediada por linfócitos Th2, para controlo de infeções helmínticas (Ezenwa & Jolles, 2011). Relativamente à época do ano, a resposta de Th1 medida através de níveis basais de IFN- γ circulantes foi mais baixa na época seca do que na época húmida. A resposta imunitária ao tratamento antihelmíntico, veio reforçar a hipótese de que a exposição a nemátodes pelo hospedeiro, altera a resposta imunitária pela via dos linfócitos Th1 (Ezenwa *et al.*, 2010). Estes resultados revelaram que, em toda a população, a TB e os helmintes têm uma associação negativa. No entanto, a alta mortalidade de indivíduos co-infetados, por si só, parece improvável que produza uma associação negativa entre o estado de infeção por TB e helmintes. Porque a mortalidade dos co-infetados, não só, reduz o número dos co-infetados, como também, reduz a transmissão de TB pelo contacto limitado entre hospedeiros susceptíveis e infetados.

Posto isto, as infeções helmínticas, além de diminuírem a resposta imunitária contra microparasitas, ao facilitar infeções de microparasitas a nível individual e, potencialmente, alterar a dinâmica da doença a nível populacional, também, comprometem a eficácia de certas vacinas bacterianas.

Num anterior estudo (Jolles *et al.*, 2008) em que Ezenwa foi co-autor, observou-se que, em búfalos livres de nemátodes, o nível de eosinófilos foi significativamente, mais elevado do que em animais infetados. Além disso, os animais coinfetados tinham uma vida útil reduzida e uma pior condição corporal, em comparação com búfalos africanos infetados apenas por TB ou apenas por nemátodes gastrointestinais.

Em Espanha, foi efetuado um estudo com o objetivo de observar a gravidade de TB em 165 javalis caçados, na presença de grupo de agentes patogénicos comuns selecionados, que contribuíam para patologias respiratórias. Os agentes concomitantes foram evidenciados por meio de técnicas serológicas e/ou deteção para circovírus suíno tipo 2 (PCV2), vírus da doença de Aujeszky (ADV), vírus da síndrome respiratória e reprodutiva suína e vírus da influenza suína; bactérias *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e o nemátode *Metastrongylus* spp. Dos 165 animais, 51,5% encontravam-se infetados com TB, 70,9% com PCV2 e 69,7% com ADV. Com uma menor percentagem 50,5% dos animais estavam infetados com *Metastrongylus* spp., 24,2% com vírus da influenza suína, 13,94% com *M. hyopneumoniae*, 4,84% com *A. pleuropneumoniae*. Com este estudo, foi evidenciado que o contacto de animais com PCV2, *Metastrongylus* spp. e ADV estava positivamente relacionado com a gravidade de infeção de tuberculose bovina; ou seja, com uma maior probabilidade de se detetar lesões de TB de padrão generalizado, nos linfonodos retrofaríngeos/submandibulares e nos pulmões (Risco *et al.*, 2014).

Foi descrito num outro estudo (Maizels *et al.*, 2004), que os helmintes têm um papel na estimulação de linfócitos T reguladores que atenuam a atividade dos linfócitos Th1 e Th2 através da ação de citoquinas imunorreguladoras, sugerindo uma via adicional, pela qual as interações helminto-microparasitas imunomediadas podem ocorrer durante uma coinfeção.

Em suma, os helmintes são parasitas capazes de alterar a imunidade do hospedeiro a favor do seu próprio benefício, podendo favorecer a sobrevivência doutros helmintes, vírus ou bactérias nas coinfeções. Ainda assim, não é possível saber se os helmintes são a causa ou efeito numa coinfeção num hospedeiro com tuberculose bovina.

3 Objetivos

Os ungulados silvestres são portadores de uma diversidade de parasitas. Alguns podem alterar o estado de saúde destes, e favorecer a entrada de outros agentes patogénicos mais prejudiciais à população, a outros animais e ao Homem. É, por isso, importante investigar se os parasitas contribuem para a manutenção da tuberculose bovina.

Este trabalho visou alcançar vários objetivos, entre eles:

1. Determinar a fauna parasitária de ungulados silvestres, nomeadamente de javalis e veados, abatidos em montarias provenientes e não provenientes da área epidemiológica de risco para tuberculose bovina, no centro e sul de Portugal Continental;
2. Avaliar os fatores de risco relacionados com a ocorrência de parasitas gastrointestinais e pulmonares observados;
3. Verificar a existência de relação entre coinfeção com *M. bovis* e endoparasitas gastrointestinais e/ou pulmonares.

4 Material e Métodos

4.1 Colheita de Amostras

As amostras fecais de javalis e veados caçados foram colhidas durante as épocas venatórias de 2011/12 a 2014/15 a partir do recto e intestino do animal (Figura 5) com equipamento de proteção adequado para o efeito como calçado, vestuário, luvas descartáveis e sempre que possível máscara. As 124 amostras foram distribuídas por 5 concelhos: 59 amostras no concelho de Moura (18 amostras de javalis e 41 de veados) (Figura 6), 44 amostras de javalis no concelho de Benavente (Companhia das Lezírias), 10 amostras de javalis no concelho de

Figura 5: Colheita de fezes após a inspeção sanitária do médico veterinário.



Barrancos, 7 amostras de javalis no concelho de Idanha-a-Nova e 4 amostras de javalis no concelho de Serpa (Gráfico 1).

Na Beira Interior Sul, as amostras foram recolhidas na época venatória de 2013/14 em zonas de caça com altitudes entre os 300 e os 500 m. Durante esse ano hidrológico, a precipitação anual foi 500-600 mm, com temperatura média anual de 14-16°C (Agência Portuguesa do Ambiente [APAmbiente], 2016).

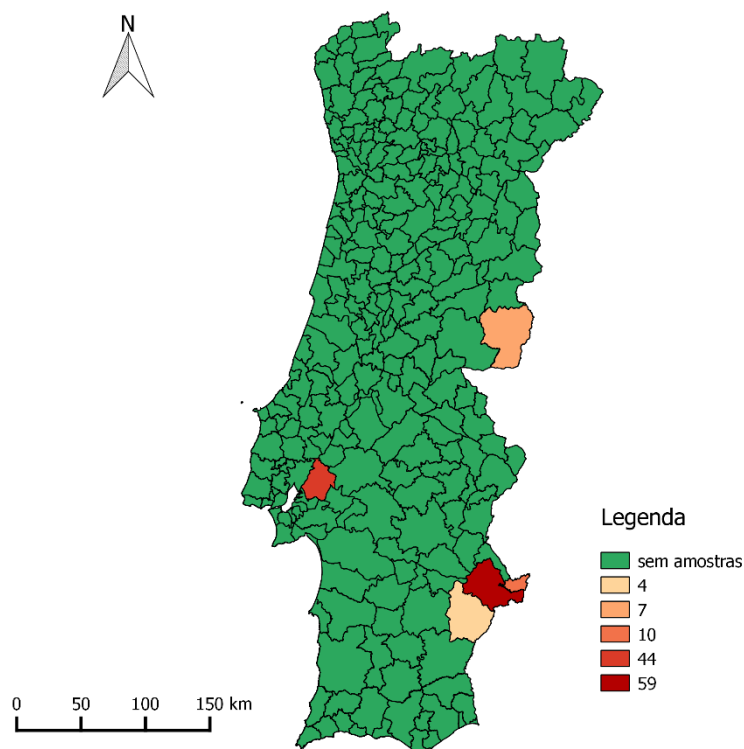
Na Lezíria do Tejo e no Baixo Alentejo, as amostras foram recolhidas nas épocas venatórias de 2011/12 a 2014. A precipitação anual rondou os 400-500 mm e temperatura média anual 15°-17°C durante os anos

hidrológicos relativos à altura da recolha de amostras (APAmbiente, 2016).

Figura 6: Veados e javalis caçados numa das montarias localizadas no Baixo Alentejo. (original)



Gráfico 1: Mapa coroplético com o número de amostras recolhidas por concelho



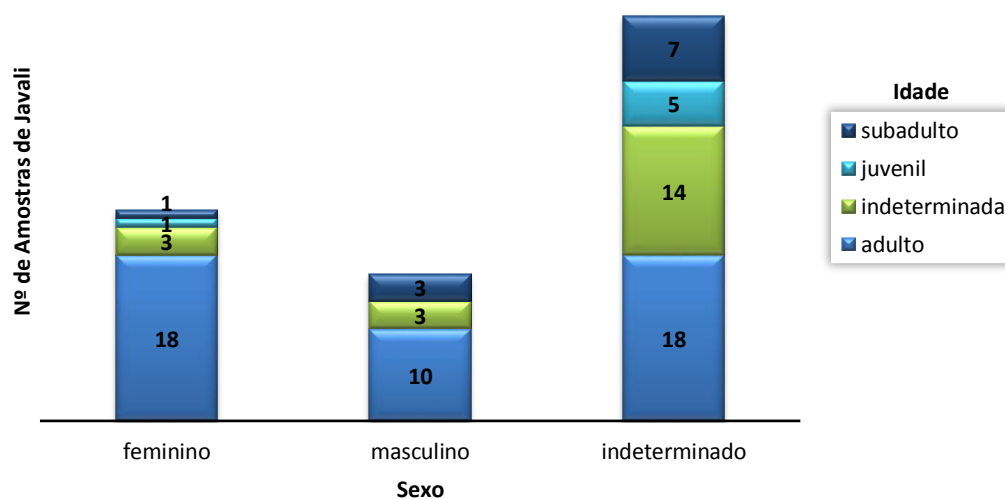
4.1.1 Identificação da Amostra

Das 124 amostras recolhidas, 83 eram de javali e 41 de veado, distribuídas por cinco concelhos diferentes.

Quer a idade e sexo dos animais foram identificados, mas não em todos, devido aos constrangimentos logísticos do trabalho de campo.

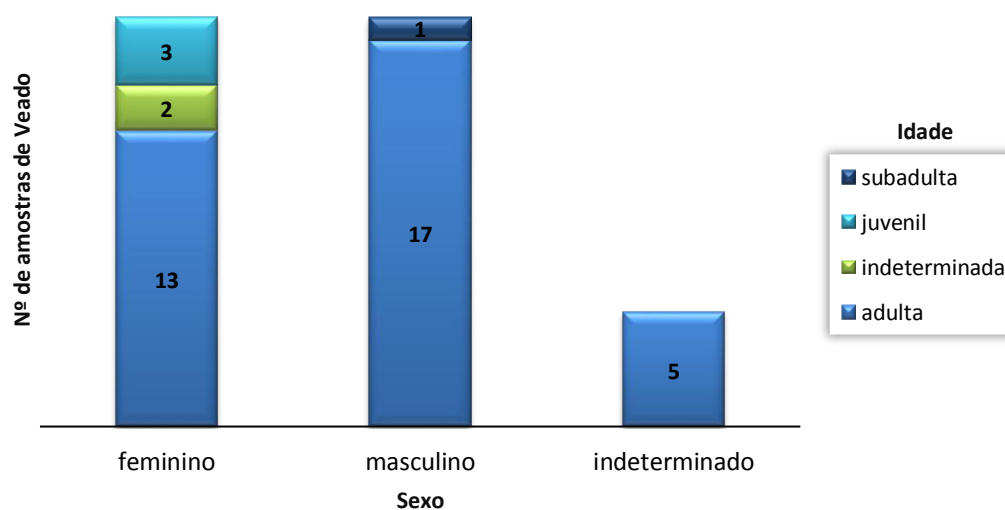
Das 83 amostras de javali, 23 eram do sexo feminino, 16 do sexo masculino e 44 amostras de javalis em que não foi possível identificar o sexo e a idade foi catalogada em juvenis (<1 ano), subadulto (1-2 anos) e adulto (>2 anos) (Gráfico 2).

Gráfico 2: Distribuição de idade e sexo das amostras de Javali



As 41 amostras de veados foram recolhidas no concelho de Moura. Das amostras recolhidas 18 eram do sexo feminino, 18 do masculino e em cinco animais não foi determinado o sexo (Gráfico 3).

Gráfico 3: Distribuição do sexo e idade das amostras de Veado



As áreas de estudo (Beira Interior e Baixo Alentejo) foram escolhidas por fazerem parte da “Área Epidemiológica de Risco para Tuberculose Bovina dos Animais de Caça Maior”, onde os javalis e veados estavam potencialmente, em contacto direto com o agente infeccioso (Direcção Geral de Alimentação e Veterinária [DGAV], 2011). A Companhia das Lezírias foi escolhida como sendo uma zona não epidemiológica de risco para infeção por *Mycobacterium* spp.

As amostras foram conservadas a temperaturas de -18°C (congeladas) e de 5°C (refrigeradas) e processadas em laboratório, através de testes coprológicos. O tempo decorrido entre o armazenamento e o processamento das amostras congeladas foi de 1 a 3 anos, enquanto nas amostras refrigeradas foi de dias a dois meses, no máximo. Na Tabela 3 é possível observar a distribuição das amostras de acordo com a conservação da amostra de animais infetados e não infetados por TB.

Tabela 3: Distribuição da conservação de amostras de animais infetados e não infetados por TB

	Javali		Veado	
Nº de amostras	83 amostras		41 amostras	
Conservação da amostra	congeladas	refrigeradas	congeladas	refrigeradas
Infetado com TB (35 animais)	24 (60%)	0 (0%)	7 (100%)	4 (11,8%)
Não infetado com TB (89 animais)	16 (40%)	43 (100%)	0 (0%)	30 (88,2%)
Total de amostras conforme a sua conservação	40	43	7	34

As amostras refrigeradas foram identificadas como positivas a TB, porque o animal correspondente apresentava lesões macroscópicas típicas de tuberculose bovina (granulomatosa, caseosa, purulenta, necrótica, calcificada ou proliferativa) nos linfonodos, no momento da inspeção efetuada pelo orientador (Gortazar, Vicente & Gavier-Widen, 2003; Santos *et al.*, 2009). Relativamente aos animais das amostras congeladas, foram recolhidas amostras de tecidos de linfonodos submandibulares, retrofaríngeos, traqueobrônquiais e mesentéricos e de pulmões para isolamento de *M. bovis* (Santos, Geraldés, Afonso, Almeida & Correia-Neves, 2010). Os métodos bacteriológicos para isolamento da micobactéria foram executados no laboratório de biossegurança de nível 3. Resumidamente, para cada animal foram homogeneizados cerca de 2-4 gramas de tecidos cortados em pequenos pedaços, com 4 ml de água destilada e 400 µl do homogeneizado; foram congelados para posterior extração de ADN (ácido desoxirribonucleico). O restante homogeneizado foi descontaminado em 35 ml de solução cloreto de hexadecilpiridínio a 0,75%. Após 2 horas de descontaminação e

centrifugação a 3500 rpm (rotações por minuto) durante 30 minutos, inoculou-se 200 µl de sobrenadante num tubo com meio de Coletos (BioMerieux, Marcy l'Étoile, France) (meio de cultura específico para isolamento de *Mycobacterium* spp.). Os tubos foram incubados a 37°C durante 10 a 15 semanas, e naqueles onde se observou um crescimento visível de micobactérias (colónias de cor amarela) foram inoculados em placas de Petri com meio de Middlebrook 7H11 enriquecido com OADC (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) e também esfregaço em lâmina de microscópio e suspensão em microtubos com 400 µl de água destilada e congelado a -18°C para posterior identificação (Santos *et al.*, 2010).

Nos animais positivos a TB, as amostras fecais foram processadas na Sala de Necrópsias da FMV-UL, com devidas precauções e material adequado. Todo o material de laboratório que era reutilizado foi lavado com detergente, e passou por um banho diluído de lixívia, permanecendo neste cerca de uma hora. O material de uso individual utilizado era descartável (fato macaco, luvas, proteção de boca “bico de pato”, proteção de mangas, avental), excetuando, a proteção de olhos que foi reutilizado, que apesar de vedar totalmente os olhos, também era facilmente lavável e resistente aos produtos de desinfecção (Figura 7). Para uma segurança reforçada, utilizaram-se dois pares de luvas, em vez de um par. A mesa de trabalho foi revestida por plástico e papel absorvente aderido à mesa com fita-cola, removido e descartado, após cada dia de trabalho (Figura 8). No final do trabalho, o microscópio, assim como a mesa foram desinfetados com desinfetante micobactericida BacilloI®.

Figura 7: Equipamento de proteção individual necessário para manusear fezes de animais potencialmente infetados com tuberculose bovina (original)



Figura 8: Revestimento feito na mesa de trabalho com plástico forrado com papel absorvente, com o auxílio de fita-cola. Sobre a mesa a presença de algum material necessário para os testes coprológicos, realizados na Sala de Necrópsias. (original)



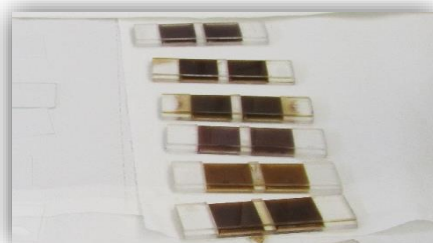
4.2 Análise de Amostras Fecais

4.2.1 Técnica de McMaster

A técnica de McMaster é utilizada para efetuar uma avaliação quantitativa do número de ovos de nemátodes gastrointestinais, presentes por grama de fezes (OPG). Requer uma lâmina intitulada de “Câmara de McMaster” (Ueno & Gonçalves, 1998; Madeira de Carvalho, 2001). Esta técnica consiste na pesagem de 2 a 3 gramas de fezes, que são posteriormente diluídos em 28 mililitros de uma solução de sacarose a 25%. Após uma boa dissolução, filtrou-se para um copo, retirou-se uma pequena quantidade de amostra, com a ajuda de uma pipeta, de forma a preencher as duas áreas da câmara (Figura 9). Para a observação microscópica usam-se as objectivas de 4x e 10x, numa ampliação total de 40 ou 100x.

O total de ovos observados na câmara é multiplicado pelo factor 50 (sendo simultaneamente o limite de deteção de ovos para a diluição utilizada), obtendo o número real de ovos por grama de fezes (Madeira de Carvalho, 2001).

Figura 9: Técnica de McMaster. Câmaras de McMaster preparadas para observação microscópica. (original)



4.2.2 Método de Willis ou Flutuação

Sendo uma técnica qualitativa, pretende-se observar ovos de parasitas gastrointestinais presentes nas fezes, que apresentem uma gravidade superior a 1. Para que os ovos flutuem, utiliza-se uma solução hipersaturada de cloreto de sódio, sulfato de magnésio ou de açúcar. Foi usada uma solução açucarada para obter uma densidade entre 1,12 e 1,20 (Ueno & Gonçalves, 1998). Foram colocados 2g de fezes em 28 mililitros de solução açucarada a 25% e homogeneizou-se para uma boa dissolução. A suspensão foi passada por um passador para um tubo de ensaio, até à formação de um menisco convexo no topo deste. Por fim, foi colocada uma lamela sobre o tubo e deixou-se repousar durante 20 minutos (Figura 10). Desta forma, os ovos de nematodes flutuam e colam-se à face inferior da lamela. Retirou-se com cuidado a lamela e transferiu-se para uma lâmina (Figura 11) e observou-se ao microscópio óptico com a objectiva de 10x, numa ampliação total de 100x (Roepstorff & Nansen, 1998).

Figura 10: Técnica de Flutuação. Tubos de ensaio com amostra e solução saturada de sacarose, com a lamela colocada no topo do tubo. (original)



Figura 11: Lamela sobre lâmina com sobrenadante. (original)



4.2.3 Sedimentação Simples

Os ovos de trematodes têm uma gravidade específica superior (1,2) aos ovos de nematodes, por isso os ovos de trematodes sedimentam. O procedimento é semelhante ao do método anterior até ao repouso da suspensão em tubo de ensaio. Depois de retirar a lamela, decantou-se o sobrenadante de forma a ficar o precipitado no fundo do tubo. Com a ajuda de uma pipeta de Pasteur homogeneizou-se o sedimento e retirou-se cerca de duas gotas para uma lâmina. O corante azul de metileno foi adicionado na lâmina com a ajuda de uma pipeta de Pasteur, em que esta toca na lâmina deixando uma pequena quantidade que é misturada com o auxílio de uma lamela, que foi posteriormente colocada sobre a lâmina para ser observado ao microscópio óptico com a objectiva de 10x ou 40x, numa ampliação total de 100x. O azul-de-metileno cora todos os detritos e componentes fecais de azul, os ovos de

tremátodes, e em especial os de *F. hepatica*, aparecem com uma coloração amarela, pois as suas paredes não absorvem o corante, desde que estejam íntegras (Roepstorff & Nansen, 1998).

4.2.4 Técnica de Baermann

Os ovos de nemátodes pulmonares passam para o trato digestivo, onde eclodem e são eliminados sob a forma de 1º estágio larvar (L1) com as fezes. O método de Baermann é utilizado para recolher estas formas larvares, uma vez que estas não conseguem deslocar-se contra a gravidade.

A técnica foi modificada, não utilizando o funil de torneira com água, mas sim um copo cónico com água. Encheu-se o copo cónico com água morna de forma a deixar espaço para colocar a gaze que envolve 5 a 15g de fezes e deixa-se repousar na *hotte* durante 24 horas (Figura 12). Passado o tempo estabelecido, retirou-se a gaze e decantou-se o sobrenadante. Homogeneizou-se o sedimento e com ajuda de uma pipeta de Pasteur colocou-se 2 a 3 gotas de sobrenadante numa lâmina e observou-se no microscópio ótico com objetiva de 10x e 40x, numa ampliação total de 100x e 400x, respetivamente (Ueno & Gonçalves, 1998).

Figura 12: Técnica de Baermann. Copo cónico com água morna e fezes envolvidos em gaze (original).



Para identificação do género através das larvas L1 dos parasitas pulmonares e do sistema nervoso central do veado, procedeu-se à medição do comprimento da larva e observou-se a ausência ou presença de espinha dorsal na terminação da cauda (Van Wyk & Mayhew, 2013). A medição do comprimento foi possível através de um programa de medição de fotografias (Rasband, 2015), visto que alguns géneros de protostrongilídeos só são diferenciados pelo seu comprimento.

4.2.5 Esfregaço Fecal para pesquisa de *Cryptosporidium* spp.

As fezes foram homogeneizadas com o auxílio de uma vareta. De seguida, as fezes que ficaram na vareta foram dispersadas sobre uma lâmina de forma a criar uma camada de fezes fina. Deixou-se secar ao ar e corou-se através da técnica de Ziehl-Neelsen modificada (Casemore, Armstrong & Sands, 1985), uma vez que este parasita é álcool-ácido resistente. Depois, colocou-se metanol sobre a lâmina durante um minuto, e de seguida fucsina durante 10 minutos. Passado esse tempo, lavou-se em água corrente e colocou-se álcool clorídrico a

1% seguido de lavagem. Finalmente, corou-se com verde malaquite durante cerca de um minuto e procedeu-se a uma nova lavagem e deixou-se secar a lâmina. A observação foi feita num microscópio óptico utilizando a objetiva de imersão (100x) obtendo uma ampliação total de 1000x. Por fim, procedeu-se à identificação e contagem em 50 campos das lâminas positivas a quistos de *Cryptosporidium* spp.

4.2.6 Coprocultura em Copo

Esta técnica é baseada na técnica de Roberts & O'Sullivan, de forma a procurar uma melhor condição de cultura larvar com a influência de humidade, oxigenação e temperatura para permitir a eclosão das larvas L1 a partir dos ovos de estrongilídeos até à sua fase infetante, a larva do 3º estágio (L3) (Ueno & Gonçalves, 1998; Madeira de Carvalho, 2001). Uma vez que é uma técnica simultaneamente quantitativa e qualitativa pesou-se a quantidade de fezes, que vai ser utilizada em cada copo. Foi efetuado um orifício no centro do copo para criar uma melhor oxigenação e de seguida tapa-se o copo com papel de alumínio, que foi posteriormente picotado com uma pinça de forma a criar várias entradas de ar, e para evitar que se crie um meio anaeróbio e que se desenvolvam fungos. Os copos foram colocados num tabuleiro que foi preenchido parcialmente com água de forma a garantir a humidade relativa necessária dentro da estufa. Por fim, foram colocados na estufa a 26-27°C cerca de 15 dias garantindo o tempo necessário para o desenvolvimento das larvas até ao estágio de L3. Após este período perfez-se com água o volume total dos copos de coprocultura e tapou-se com uma placa de Petri. De seguida, inverteu-se o copo e colocou-se água nesta deixando repousar durante 24 horas (Figura 13). As L3 têm higrotropismo e fototropismo positivo, sendo que o procedimento permitiu a migração das L3 da massa fecal para o líquido circundante e finalmente para o líquido da placa de Petri. Recolheu-se o líquido presente na placa para um tubo de ensaio (Figura 14) e conservou-se à temperatura de refrigeração (4°C) para posterior observação (Madeira de Carvalho, 2001).

Figura 13: Copos de coprocultura invertidos sobre a placa de Petri. (original)



Figura 14: Tubos de ensaio com líquido que se encontrava na placa de Petri. (original)



Para a contagem e identificação das formas larvares infetantes, centrifugou-se as amostras durante 3 minutos a 1200 rpm (rotações por minuto) e observou-se a “olho nu” o volume de precipitado para determinar qual o volume de sobrenadante que, se deve manter no tubo de ensaio, podendo ser 10; 5; 2,5 ou 1 ml. De seguida, homogeneizou-se, levemente, para permitir a dispersão das larvas infetantes e retira-se uma alíquota de 100 µl com auxílio de uma micropipeta automática para uma lâmina, podendo ou não colocar lamela.

Finalmente, observou-se ao microscópio ótico, numa ampliação de 4x e 10x, fazendo a contagem de 100 larvas ou até esgotar o conteúdo do tubo caso sejam menos de 100.

As larvas foram identificadas após terem sido imobilizadas com algumas gotas de solução de Lugol a 5%, as larvas de vida livre ficam coradas de amarelo-acastanhado, ao contrário das L3 que permanecem inalteradas por um considerável espaço de tempo (Ueno & Gonçalves, 1998; Madeira de Carvalho, 2001).

Visto que não existem chaves dicotómicas para a identificação das larvas infetantes de veados, recorreu-se a chaves dicotómicas de pequenos ruminantes, por apresentarem nemátodes idênticos a estes (Gibbons, Jacobs, Fox & Hansen, 2011). A identificação foi realizada através de características morfológicas, nomeadamente, o comprimento total da L3, presença ou não de bainha, o formato da extremidade anterior, a presença ou ausência de corpos ovalares refringentes, o número e formato das células intestinais, distância entre a ponta da cauda da larva e a ponta da cauda da bainha e, ainda, a presença ou ausência de filamento da bainha da cauda (Roepstorff & Nansen, 1998; Ueno & Gonçalves, 1998; Gibbons, Jacobs, Fox & Hansen, 2011; Van Wyk & Mayhew, 2013). O nº de L3 por coprocultura foi multiplicado por um número até perfazer o volume inicial (10 ml, ou seja 10000 µl). Por exemplo o nº de L3 observado numa alíquota de 100 µl é multiplicada para chegar ao volume inicial.

$$LPG = \frac{n^{\circ} L3 \text{ total na coprocultura}}{\text{Peso da coprocultura (g)}}$$

$$R\% = \frac{LPG}{OPG} \times 100$$

Após se saber o nº de larvas por grama (LPG) calcula-se o rendimento de desenvolvimento larvar na coprocultura em copo (R%) (Madeira de Carvalho, 2001).

4.3 Análise Estatística

A análise estatística foi efetuada com Microsoft Excel®, versão Microsoft Office 2010® (Microsoft, Redmond, Washington, USA), o programa estatístico R versão 3.3.1 para Windows da The R Foundation 2016 (The R Project for Statistical Computing) para cálculo de média, mediana, percentagens e avaliação de factores de risco. A força de associação entre os fatores de risco (variável independente) e a ocorrência de parasitose foi medido pelo risco relativo ou *odds ratio* (OR) para as variáveis dicotômicas (distribuição binomial). Para a interpretação do modelo de regressão de Poisson, foi medido pelo rácio da incidência ou *incidence ratio* (IR), utilizado para as variáveis numéricas (distribuição de Poisson). Para saber como varia o estado de infeção parasitária, através de cada teste coprológico utilizou-se como variáveis independentes a idade, o sexo, sub-região, evidência de infeção tuberculosa e a conservação da amostra.

O nível de significância utilizado para cada modelo foi $\alpha=0,05$ com um intervalo de confiança de 95% (IC_{95%}) e qualificado através do critério de informação de Akaike (AIC). Para valores de *p* designou-se valores entre [0,05 - 0,01] estatisticamente significativos; entre [0,01 – 0,001] muito significativos e inferiores a 0,001 extremamente significativos.

5 Resultados

5.1 Parasitas Observados nas amostras de Javali

5.1.1 Prevalência Global

Foram testados 83 javalis em que 68 animais (78,3%) foram positivos, em pelo menos um teste coprológico (Willis, sedimentação, Baermann, McMaster, esfregaço para identificação de *Cryptosporidium* spp.).

5.1.2 Análise de Fatores de Risco

Para esta análise foi calculada a razão de verosimilhança, *Odds ratio* com intervalo de confiança de 95%. Foram apresentados os valores em que o valor de significância era $p < 0,05$. Todas as variáveis independentes foram incluídas no modelo inicial e retiradas, sequencialmente, aquelas com menos efeito significativo $p > 0,05$ (Tabela 4). No teste de Willis, para pesquisa de ovos tipo estrongilídeo, se as amostras forem congeladas, a probabilidade de encontrar parasitas diminui drasticamente. Nas amostras refrigeradas, a probabilidade de encontrar ovos de estrongilídeos foi 78 vezes maior que nas amostras congeladas, sendo extremamente significativo. Em relação às coccídias, a probabilidade de se encontrarem oocistos é 32 vezes maior do que nas amostras congeladas, com significância estatística (Tabela 4).

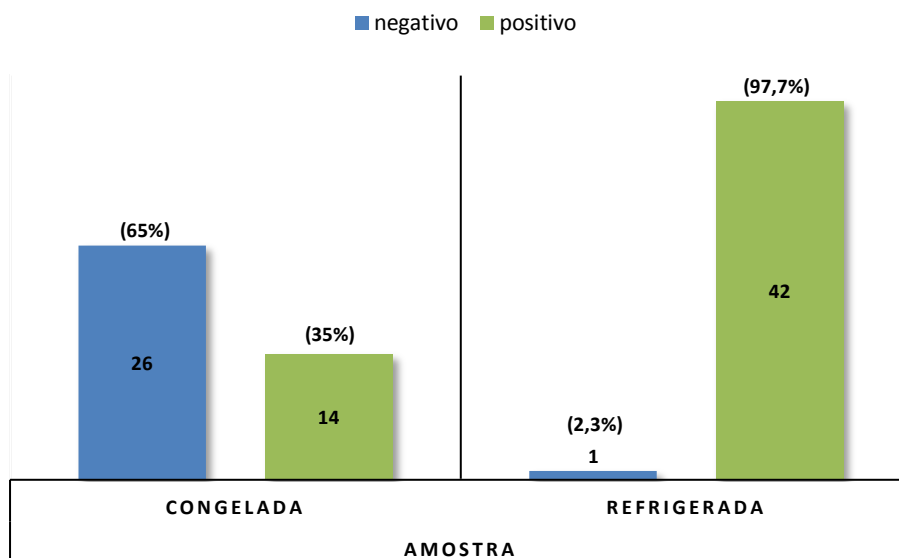
Tabela 4: Análise Multivariada das amostras de javalis

Parasita /Teste coprológico	Variáveis Independentes	<i>p</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>Incidence ratio</i>	95% IC (2,5%-97,5%)
Estrongilídeos /Willis	Refrigeração	0,001	78,00	n.a.	14,52 - 1456,78
	Baixo Alentejo	0,05	15,80	n.a.	2,25 - 339,94
Coccídias /Willis	Beira Interior Sul	0,19	10,35	n.a.	0,258 - 506,92
	Refrigeração	0,01	32,56	n.a.	3,70 – 927,93
	[juvenil-subadulto]	0,01	29,58	n.a.	4,00 – 673,05
<i>Metastrongylus</i> sp. /Sedimentação	Baixo Alentejo	0,01	4,66	n.a.	1,66 – 14,25
	Beira Interior Sul	0,91	0,88	n.a.	0,04 – 6,38
<i>Cryptosporidium</i> /Esfregaço	[juvenil-subadulto]	0,001	n.a.	17,57	8,69 – 37,67
	Sexo feminino	0,001	n.a.	37,76	8,07 – 673,30
Estrongilídeos /McMaster	[juvenil-subadulto]	0,001	n.a.	1,86	1,73 – 2,00
	Sexo feminino	0,001	n.a.	3,15	2,93 – 3,39
Coccídias /McMaster	Baixo Alentejo	0,001	n.a.	2,27	2,22 – 2,32
	Beira Interior Sul	0,80	n.a.	$4,8 \times 10^{-08}$	$4,3 \times 10^{-42}$ – $4,3 \times 10^{-42}$

No Gráfico 4 é possível constatar que a conservação da amostra teve um papel importante na observação de ovos tipo *estrongilídeo*.

Visto que a conservação da amostra teve uma grande influência na presença de parasitas nas amostras fecais, os resultados de cada teste coprológico foram divididos conforme a conservação da amostra.

Gráfico 4: Nº de amostras positivas e negativas para ovos tipo *estrongilídeo* através do teste de Willis conforme o método de conservação (prevalência)



Seguidamente, serão apresentados os resultados das amostras refrigeradas, em que todos os animais não estão infetados por *M. bovis*. Estes resultados serão subdivididos em testes qualitativos e quantitativos. Depois serão apresentados os resultados das amostras congeladas, que são referentes a animais infetados e não infetados por *M. bovis*.

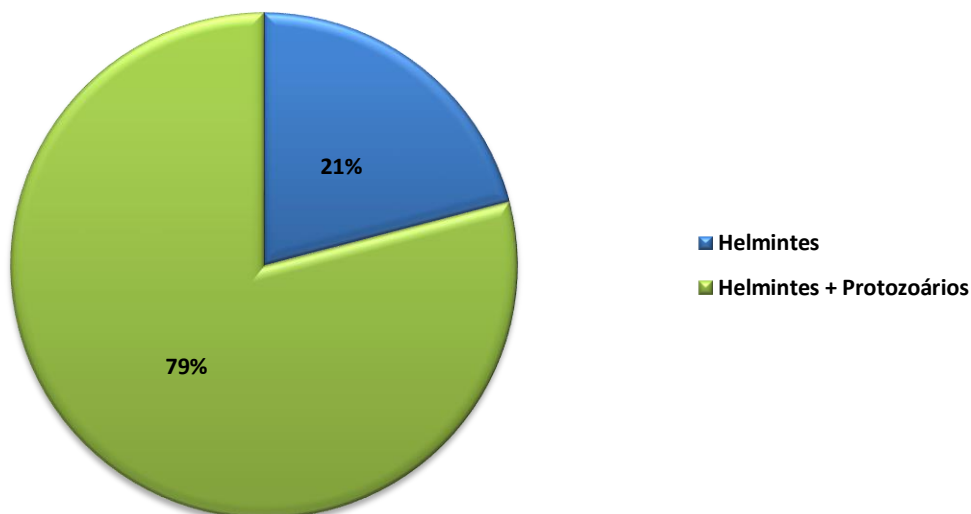
5.1.3 Amostras refrigeradas (de animais não infetados com TB)

Estas 43 amostras foram recolhidas na sub-região do Baixo Alentejo (Moura – 11 javalis, Serpa – 4 javalis) e da Lezíria do Tejo (Benavente – 28 javalis). Na grande maioria das amostras não foi possível determinar o sexo e a idade.

Em relação ao sexo, foi determinado 9 fêmeas e 2 machos e, ainda 7 com idade inferior a dois anos e 22 javalis superiores a dois anos.

Através das técnicas coprológicas, verificou-se que todos os javalis analisados se encontravam parasitados em pelo menos um dos testes (Willis, McMaster, Coprocultura, Sedimentação e Baermann). Registou-se em 79% dos animais analisados a coexistência de nemátodes e protozoários, e apenas 21% dos animais exclusivamente com nemátodes (Gráfico 5). Observou-se, também, que os oocistos de coccídias não se encontravam esporulados.

Gráfico 5: Distribuição do parasitismo apenas por helmintos e por helmintos com protozoários nas amostras refrigeradas de javali



5.1.3.1 Testes Qualitativos para parasitas gastrointestinais, hepáticos e pulmonares

Todos os testes qualitativos foram positivos em pelo menos uma amostra.

No teste de Willis, a prevalência global foi de 100% (n=43), tendo sido identificados ovos do tipo estrongilídeo (*Hyoststrongylus* sp./*Oesophagostomum* sp.) em 42 de 43 amostras (P=97,7%; IC_{95%}=87,9-99,6%), ovos de *Strongyloides* sp. em 8/43 amostras (P=18,6%; IC_{95%}=9,7-33,3%), e oocistos da família *Eimeriidae* em 13/43 amostras (P=30,2%; IC_{95%}=18,6-45,1%). Na sedimentação observou-se que mais de metade das amostras encontravam-se parasitadas, 23/43 amostras (P=53,5%; IC_{95%}=38,9-67,5%). Foram observados ovos com larva L1 de *Metastrongylus* spp. (Figura 15) em 15 das 43 amostras (P=34,9%; IC_{95%}=22,4-49,8%), ovos do género *Trichuris* (Figura 16) em 6/43 amostras (P=14,0%; IC_{95%}=6,6-27,3%) e ovos de *Fasciola hepatica* em 3/43 amostras (P=7,0%; IC_{95%}=2,4-18,6%). Foi verificado ainda, a presença numa amostra positiva para *Balantidium* sp. e outra para *Physocephalus* sp. com 2,3% de prevalência (IC_{95%}=0,4-12,1%). Com a técnica de Baermann foi possível identificar a presença de ovos de ascarídeos em 2/43 amostras (P=4,7%; IC_{95%}=1,3-15,5%), todas elas de *Ascaris suum* (Figura 17) (Gráfico 6).

O segundo grupo de parasitas mais observado, foi *Metastrongylus* spp., pois teve uma prevalência de 53,3%, IC_{95%}= 30,1-75,2% nas amostras dos animais provenientes do Baixo Alentejo (8/15 javalis), enquanto nos animais da Lezíria do Tejo a prevalência foi inferior, 25% das amostras; IC_{95%}=12,7-43,4% (7/28 javalis). Nos animais jovens, a prevalência observada

neste parasita foi de 57,1%, IC_{95%}=25,0-84,2% (4/7 javalis) e nos adultos obteve-se um valor inferior, 31,8%, IC_{95%}=16,4-52,7% (7/22 javalis). As coccídias foram os parasitas com a terceira maior prevalência, tendo sido observado que as amostras da Lezíria do Tejo obtiveram uma menor percentagem comparadas com as do Baixo Alentejo, 17,9%, IC_{95%}=7,9-35,6% (5/28 javalis) e 53,3%, IC_{95%}=30,1-75,2% (8/15 javalis), respetivamente.

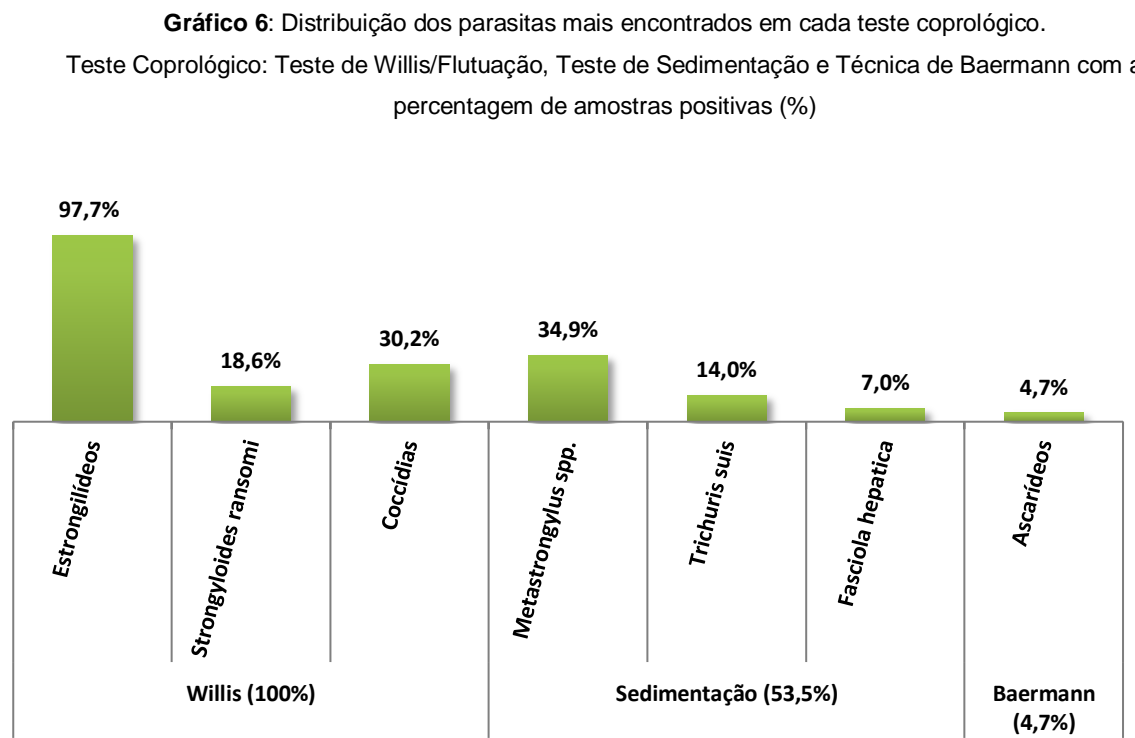


Figura 15: *Metastrongylus* sp. em amostra de javali, observado através do teste de sedimentação. (original)



Figura 16: *Trichuris suis* observado através do teste de sedimentação. (original)



Figura 17: *Ascaris suum* observado através da técnica de Baermann. (original)



5.1.3.2 Testes Quantitativos para parasitas da subordem Strongylida e protozoários.

Nos testes quantitativos (McMaster e contagem de oocistos de *Cryptosporidium* por campo de esfregaço fecal (Figura 18)), observou-se que mais de cinco sextos das amostras, foram positivas ($P=88,4\%$; $IC_{95\%}=75,5-94,9\%$), ou seja, 38 das 43 amostras. No teste de McMaster observou-se que apenas 7 amostras foram negativas para a pesquisa de ovos tipo strongilídeo (*Hyostrogylus* sp./*Oesophagostomum* sp.), ou seja, 83,7% amostras positivas, $IC_{95\%}=70,0-91,9\%$ (36/43 amostras). Contrariamente, na pesquisa de oocistos da família *Eimeriidae* observou-se que apenas 5 das 43 amostras eram positivas ($P=11,6\%$; $IC_{95\%}=5,1-24,5\%$).

Com o teste de McMaster foi possível contabilizar o número de ovos por grama do tipo strongilídeo (OPG) e, ainda, o número de oocistos por grama (OoPG) (Gráfico 7 e Gráfico 8). A média de ovos do tipo strongilídeo por grama foi de 534 ± 748 OPG (Tabela 5) e a de oocistos por grama foram 690 ± 3181 OoPG, observando-se um desvio padrão elevado (Tabela 6) pela ausência do parasita em grande parte das amostras (Gráfico 7 e Gráfico 8). A pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. foi positiva em 30 amostras ($P=69,8\%$; $IC_{95\%}=54,9-81,4\%$) com uma média de $0,21 \pm 0,37$ oocistos por campo (OoPC) ou uma média de $10,33 \pm 18,67$ oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 50 campos de esfregaço (Oo50C) (Tabela 7 e Gráfico 9). *Giardia* sp. também foi pesquisada pelo mesmo método que o anterior, mas todas as amostras foram negativas.

Gráfico 7: Distribuição da frequência relativa percentual de animais por classes de contagem de ovos por grama (OPG)

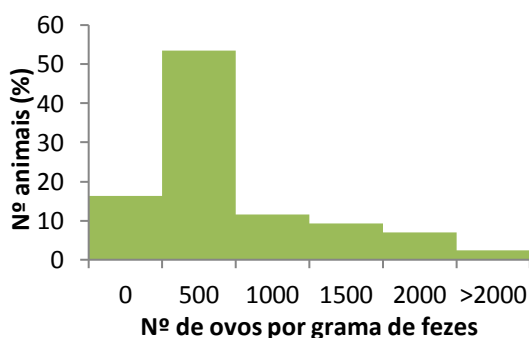


Tabela 5: Média, máximo, mediana e mínimo da contagem de ovos por grama (OPG)

Nº de OPG	
média±desvio padrão	534 ±748
máximo	4050
mediana	350
minímo	0

Gráfico 8: Distribuição da frequência relativa percentual de animais por classes de contagem de oocistos por grama (OoPG)

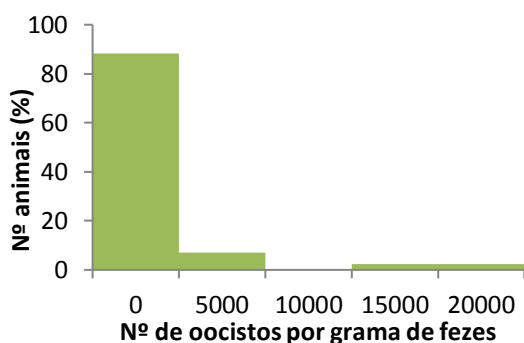


Tabela 6: Média, máximo, mediana e mínimo da contagem de oocistos por grama (OoPG)

Nº de OoPG	
média±desvio padrão	690 ± 3181
máximo	184000
mediana	0
mínimo	0

Gráfico 9: Distribuição da frequência relativa percentual de animais por classes de contagem de oocistos de *Cryptosporidium* sp. em 50 campos de esfregaço fecal (Oo50C)

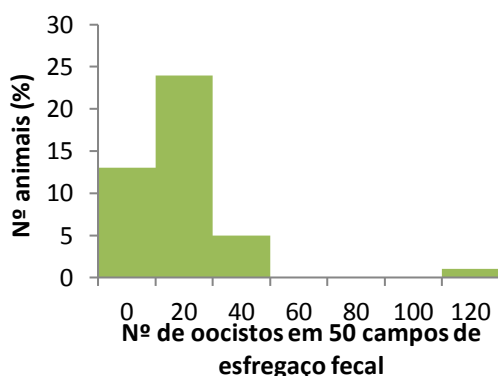


Tabela 7: Média, máximo, mediana e mínimo da contagem oocistos por 50 campos de esfregaço (Oo50C)

Nº de Oo50C	
média±desvio padrão	10,33 ± 18,67
máximo	115
mediana	5
mínimo	0

Em relação à idade, pôde observar-se que os animais jovens apresentaram médias mais elevadas de OPG, do que os animais adultos com 629 ± 646 OPG e 395 ± 573 OPG, respetivamente. A nível de prevalências, os jovens apresentaram 85,7% de positivos, $IC_{95\%}=48,7-97,4\%$ (6/7 animais) e os adultos 72,7%, $IC_{95\%}=51,9-86,9\%$ (16/22 animais). O mesmo foi observado com a contagem de oocistos de *Cryptosporidium* spp., com uma média $10,43 \pm 8$ Oo50C para os juvenis e subadultos e $9,68 \pm 24,62$ Oo50C para os adultos. Em termos de prevalências, os jovens e os adultos obtiveram 85,7% positivos, $IC_{95\%}=48,7-97,4\%$ (6/7 animais) e 50%, $IC_{95\%}=30,7-69,3\%$ (11/22 animais), respetivamente.

Relativamente ao sexo, as fêmeas tiveram uma média mais elevada em comparação com os machos na contagem de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 50 campos de esfregaço, tendo sido obtido $3,67 \pm 7,35$ Oo50C e $0,5 \pm 0,71$ Oo50C, respetivamente.

Observou-se que houve diferenças de contagem de OPG conforme o local das amostras. Os javalis da Lezíria do Tejo tiveram uma média de 786 ± 823 OPG, superior às do Baixo Alentejo que obtiveram 63 ± 108 OPG (Gráfico 10). Todos os animais da Lezíria do Tejo encontravam-se parasitados, enquanto os do Baixo Alentejo apenas 53,3% se encontravam infetados. Contrariamente, animais desta última sub-região obtiveram médias superiores de Oo50C em comparação com as da Lezíria do Tejo, $13,07 \pm 29,04$ Oo50C e $8,86 \pm 9,92$ Oo50C, respetivamente.

Figura 18: Oocistos de *Cryptosporidium* sp. em amostras de javali, observados através do esfregaço fecal. Neste esfregaço contabilizaram-se 115 oocistos em 50 campos. (original)

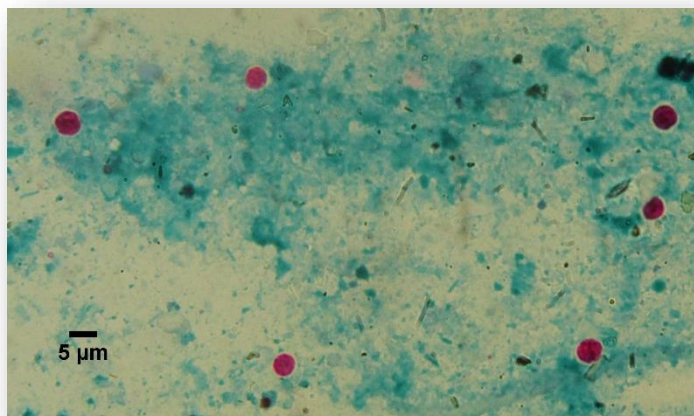
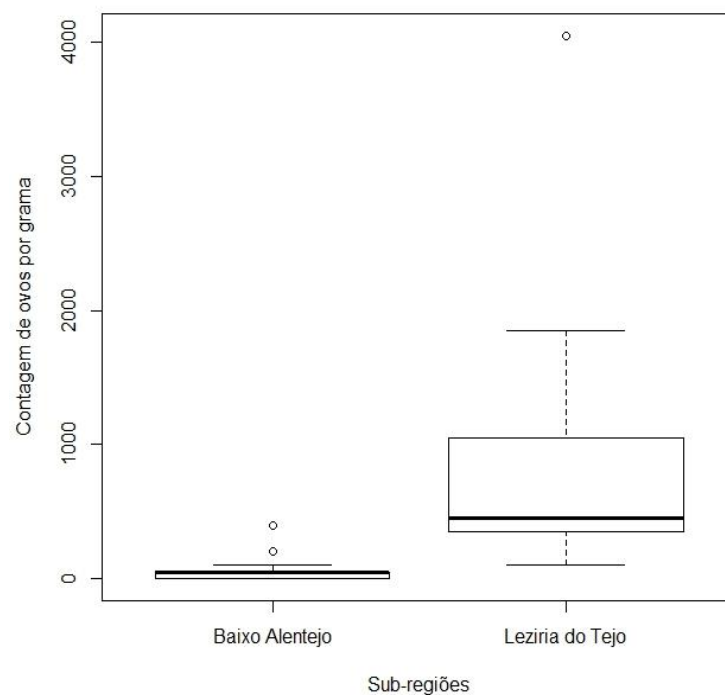


Gráfico 10: Contagem de ovos do tipo estrongilídeo por grama de fezes de javali nas diferentes sub-regiões



5.1.3.3 Teste Quantitativo para larvas infetantes (L3) da subordem Strongylida

Na contagem e identificação de larvas L3 por grama de fezes (LPG), através da técnica coprológica de coprocultura em copo, foi apenas, observada numa amostra proveniente da Lezíria do Tejo, com larvas infetantes do género *Oesophagostomum*. A média de larvas por grama foi de 11,8 LPG, com um rendimento de desenvolvimento larvar de 0,6%.

5.1.3.4 Análise de Factores de Risco

Na análise de regressão logística (Tabela 8) observou-se que o risco de infeção por coccídias em animais com idade inferior a dois anos foi 6,67 vezes maior, do que em animais adultos, com significado estatístico. A prevalência de animais jovens parasitados com coccídias foi de 71,4% (5/7 jovens), IC_{95%}=35,9-91,8%, sendo superior à prevalência dos animais adultos (P=27,3% IC_{95%}=13,2-48,2%), com 6 positivos em 22 adultos. Relativamente à contagem de oocistos de coccídias por grama de fezes, observou-se que tende a ser maior em animais provenientes do Baixo Alentejo do que os da Lezíria do Tejo, sendo extremamente significativo. No entanto, é importante frisar que, no Baixo Alentejo, as coccídias foram observadas apenas num animal.

A excreção de ovos do tipo *estrongilídeo* foi mais evidente em animais do sexo feminino e em idades inferiores a dois anos. Visto que, o rácio de incidência foi 1,13 para o sexo feminino, pode-se então afirmar que o sexo masculino teve menos 11,5% probabilidade de ter mais intensidade parasitária e o animal adulto menos 8,27% probabilidade. A excreção de oocistos do protozoário *Cryptosporidium* spp., tende a ser 13,50 vezes maior nos jovens, comparativamente aos adultos. Nas fêmeas a excreção de oocistos deste parasita foi 22,63 vezes maior do que nos machos.

Tabela 8: Análise Multivariada das amostras refrigeradas de javalis não infetados com tuberculose bovina

Parasita /Teste coprológico	Variáveis Independentes	p	Odds ratio	Incidence ratio	95% IC (2,5%-97,5%)
Coccídias /Flutuação	[juvenil-subadulto]	0,05	6,67	n.a.	1,12 – 56,45
Coccídias /McMaster	Baixo Alentejo	0,001	n.a.	3,08	3,00 – 3,15
Estrongilídeos /McMaster	Sexo feminino	0,001	n.a.	1,13	1,05 – 1,23
	[juvenil-subadulto]	0,05	n.a.	1,09	1,01 – 1,17
<i>Cryptosporidium</i> spp. /esfregaço	[juvenil-subadulto]	0,001	n.a.	13,50	6,65 – 28,98
	Sexo feminino	0,001	n.a.	22,63	4,79 – 404,59

5.1.4 Amostras congeladas (de animais infetados e não infetados com TB)

As 40 amostras congeladas foram colhidas em três sub-regiões diferentes de Portugal Continental: Beira Interior Sul com 7, Lezíria do Tejo com 16 e Baixo Alentejo com 17 amostras. Relativamente ao sexo, identificaram-se 14 fêmeas e 14 machos e nas restantes 12 amostras não foi possível identificar o sexo. A idade foi dividida em subclasses em que 24 amostras eram de animais adultos (mais de 2 anos) e 10 amostras de animais jovens (menos de 2 anos), restando 6 amostras nas quais não foi possível determinar a idade.

As amostras foram divididas conforme o estado de infeção de tuberculose bovina dos animais: animais infetados (e de zonas epidemiológicas de risco para TB) e não infetados (e zonas não epidemiológicas de risco para TB), com 24 e 16 amostras, respetivamente.

Globalmente, observou-se que 25 das 40 amostras encontravam-se parasitadas ($P=62,5\%$; $IC_{95\%}=47,0-75,8\%$). Nos animais não infetados com TB, 43,8% (7/16 amostras) encontravam-se parasitados, em que apenas foram registados 3 tipos diferentes de helmintes: ovos do tipo estrongilídeo em 4 das 16 amostras ($P=25,0\%$; $IC_{95\%}=10,2-49,5\%$), ovos de *Fasciola hepatica* em apenas uma amostra ($P=6,3\%$; $IC_{95\%}=1,1-28,3\%$) e duas amostras com ovos de *Ascaris suum* (Figura 20) ($P=12,5\%$; $IC_{95\%}=3,5-36,0\%$).

Nos animais infetados com TB, 75,0% (18/24 amostras) encontravam-se parasitados, em que se observou 4 tipos diferentes de parasitas: ovos do tipo estrongilídeo (Figura 19) em 10 das 24 amostras ($P=41,7\%$; $IC_{95\%}=24,5-61,2\%$), ovos do género *Metastrongylus* (Figura 21) em 8 das 24 amostras ($P=33,3\%$; $IC_{95\%}=18,0-53,3\%$); oocistos não esporulados em 5/24 amostras ($P=20,8\%$; $IC_{95\%}=9,2-40,5\%$) e apenas uma amostra com quistos de *Balantidium* spp. ($P=4,2\%$; $IC_{95\%}=0,7-20,3\%$). Os testes quantitativos de pesquisa de *Cryptosporidium* spp. foram negativos, assim como o teste de McMaster para ovos tipo estrongilídeo e para oocistos de coccídias.

Neste grupo de amostras não houve relação significativa entre os parasitas encontrados e a presença de tuberculose bovina.

Figura 19: Ovo do tipo estrongilídeo em amostra congelada de javali, observado através da técnica de Baermann. (original)



Figura 20: Ovo de *Ascaris suum* em amostra congelada, observado através da técnica de Baermann. (original)



Figura 21: Ovo de *Metastrongylus* sp. com L1 em amostra congelada de javali. Observado através da técnica de Baermann. (original)



A colheita de amostras foi efetuada no Baixo Alentejo, contabilizando-se 41 amostras de veados. Destas amostras, 34 estavam refrigeradas e apenas 7 amostras congeladas. Esta amostra era constituída por 35 adultos, 4 jovens e 2 amostras que não foram classificadas quanto à idade. Relativamente ao sexo, 18 eram de fêmeas, 18 de machos, e 5 que não foram catalogadas. Do total de amostras, 11 veados estavam infetados por *Mycobacterium* spp. e os restantes 30 não se encontravam infetados.

5.2 Parasitas Observados nas amostras de Veado

5.2.1 Prevalência Global

Dos testes coprológicos efetuados, 78% das amostras (32/41) encontravam-se parasitadas.

5.2.1.1 Análise de Fatores de Risco

Nas amostras submetidas a refrigeração, a probabilidade de se encontrarem parasitadas com ovos do tipo *estrongilídeo* foi 6,9 vezes maior do que nas amostras congeladas e sendo estatisticamente significativo (Tabela 9). Verificou-se que a conservação da amostra é um fator de risco, e apesar de só ser evidenciado no teste de Willis, recorreu-se à separação das amostras, conforme o seu estado de conservação, como foi efetuado com as amostras de javali.

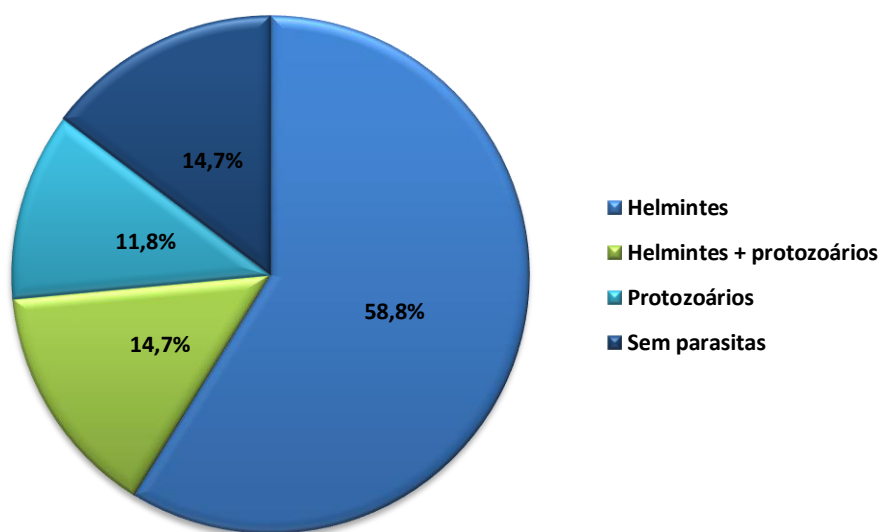
Tabela 9: Análise dos fatores de risco em amostras de veado

Parasita /Teste coprológico	Variáveis Independentes	<i>p</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>Incidence ratio</i>	95% IC (2,5%-97,5%)
Estrongilídeos /Willis	Refrigeração	0,05	6,9	n.a.	1,26-54,97
Estrongilídeos /McMaster	Positivo a TB	0,001	n.a.	5,0	4,11 - 6,11
	Sexo masculino	0,001	n.a.	2,6	2,13 - 3,17
<i>Cryptosporidium</i> spp. /esfregaço	Sexo masculino	0,05	n.a.	4,0	1,27 - 17,56

5.2.2 Amostras refrigeradas (de animais infectados e não infectados por TB)

As amostras fecais deste grupo foram colhidas no final de novembro e meados de dezembro de 2014. Das 34 amostras refrigeradas, apenas 4 eram de animais infectados pela micobactéria. Foi possível observar que 14,7% (5/34) das amostras foram negativas aos testes coprológicos e que apenas em 14,7% (5/34) se observou a presença concomitante de helmintes e protozoários. Mais de metade das amostras apresentava apenas helmintes (58,8%; 20/34 amostras) e apenas 11,8% (4/34) apenas protozoários (Gráfico 11).

Gráfico 11: Distribuição do parasitismo em animais apenas com helmintes, com helmintes e protozoários, apenas com protozoários e sem parasitas nas amostras refrigeradas de veado



5.2.2.1 Testes Qualitativos para parasitas gastrointestinais, hepáticos e pulmonares

Globalmente, com o teste de Willis observou-se que 76,5% (26/34) dos animais estavam parasitados. No teste de sedimentação apenas duas amostras foram positivas (5,9%), sendo estas positivas a TB. Com o teste de Baermann, 35,3% das amostras foram positivas (12/34) (Gráfico 12).

Relativamente aos parasitas mais encontrados, no total de amostras refrigeradas, obtiveram-se as seguintes prevalências: 73,5% (25/34) para ovos de estrongilídeos (Figura 22); 26,5% (9/34) para *Elaphostrongylus* sp. (Figura 25 e Figura 26); 17,6% (6/34) para oocistos de *Eimeria* spp. (Figura 27); 14,7% (5/34) para ovos do tipo *Strongyloides* sp. (Figura 23) e 11,8% (4/34) para *Varestrongylus* sp. No Gráfico 12, ainda se observa que os animais infectados com TB tinham uma prevalência mais elevada de parasitas (100%; n=4) do que nos veados não infectados com TB (86,7%; n=30), mas com a ressalva de que a amostra é muito reduzida.

Gráfico 12: Distribuição de parasitas encontrados em veados nos testes coprológicos qualitativos, conforme a presença/ausência de tuberculose. Cada teste coprológico apresenta a percentagem de amostras positivas

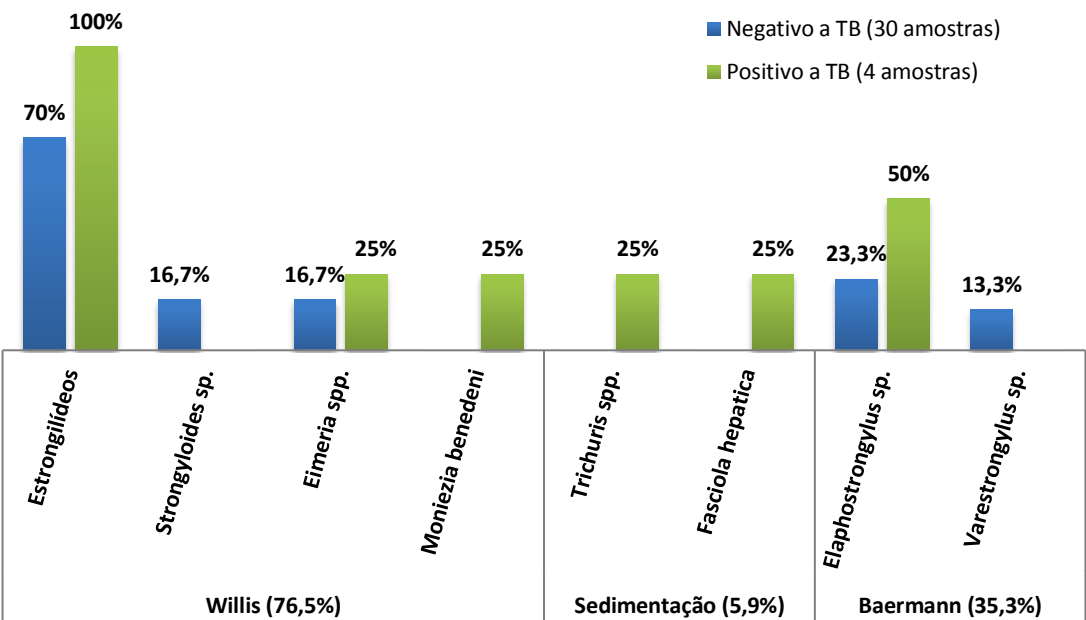


Figura 22: Ovos do tipo estrongilídeo em amostras de veado. Teste coprológico utilizado – Flutuação (original)



Figura 23: Ovo de *Strongyloides sp.* em amostra de veado. Teste coprológico – Flutuação (original)



Figura 24: *Moniezia benedeni* em amostra de veado. Teste coprológico utilizado – Flutuação (original)



Figura 25: Larva L1 de *Elaphostrongylus* sp. observada através da técnica de Baermann. (original)

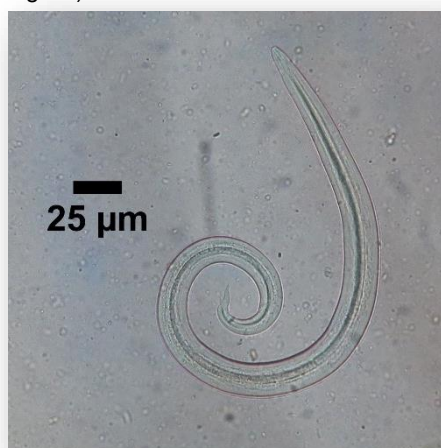
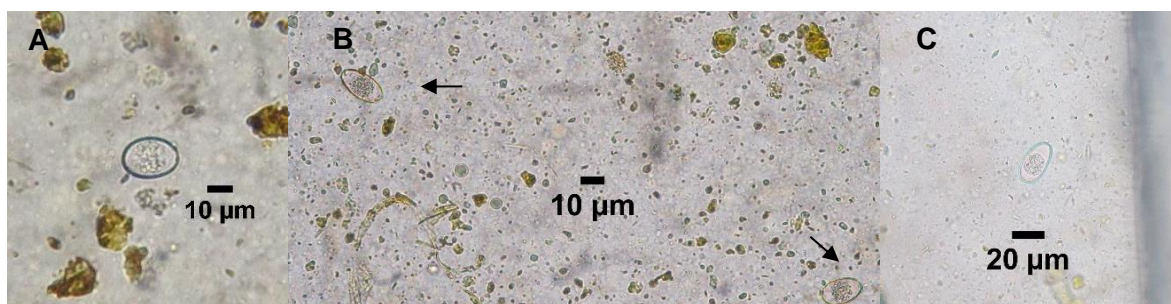


Figura 26: Pormenor da cauda da larva L1 de *Elaphostrongylus* sp. com espinha dorsal. Teste coprológico utilizado – Técnica de Baermann. (original)



Figura 27: Oocistos de *Eimeria* assinalados em amostras de veados. A e B em amostras frescas de animais não infetados. As setas indicam os oocistos de *Eimeria*. C em amostra fresca de animal infetado com TB. Teste coprológico utilizado: Flutuação. (original)



5.2.2.2 Testes Quantitativos para parasitas da subordem Strongylida e protozoários

O teste de McMaster utilizado para contagem de ovos tipo estrongilídeo e oocistos de *Eimeria* foi positivo em 6 das 34 amostras ($P=17,6\%$; $IC_{95\%}=8,4-33,5\%$), todas elas com ovos do tipo estrongilídeo com uma média de $14,71 \pm 38$ OPG (min.0 – máx.150) (Gráfico 13). O esfregaço fecal para pesquisa de *Cryptosporidium* spp. foi positivo em apenas 4 amostras (11,8%), tendo sido contabilizado em 50 campos os oocistos presentes no esfregaço (Gráfico 14). A contagem de oocistos por 50 campos teve uma média de $1,4 \pm 5,8$ Oo50C (min. 0 – máx. 33); ou seja, uma média de $0,028 \pm 0,114$ oocistos/campo.

Gráfico 13: Distribuição da frequência relativa percentual de animais por classes de contagem de ovos por grama (OPG)

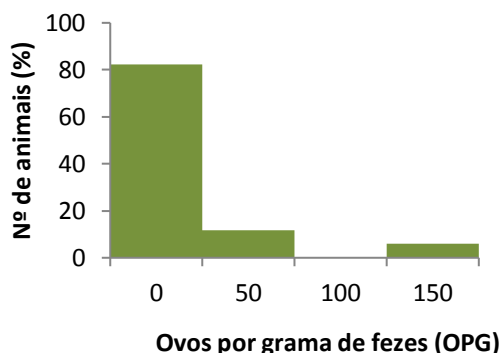
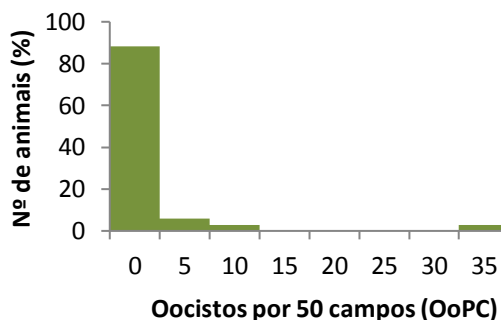


Gráfico 14: Distribuição da frequência relativa percentual de animais por classes de contagem de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 50 campos de esfregaço fecal (Oo50C)



5.2.2.3 Testes Quantitativos para larvas L3 da subordem Strongylida

Quanto às larvas L3 foram identificados dois gêneros: *Ostertagia* numa amostra e *Oesophagostomum* em três amostras. O número médio de larvas infetantes foi 6,52 LPG. O rendimento de desenvolvimento larvar foi 55,29%.

5.2.2.4 Análise de Factores de Risco

Através da análise multivariada (Tabela 10), verificou-se que a excreção de ovos do tipo estrongilídeo tende a ser superior em amostras de veados infetados por micobactérias do que nos não infetados. Apesar de ter sido extremamente significativo, temos de ter em conta que o número de animais infetados com TB foram apenas quatro. E destes quatro só em duas amostras é que foi possível contabilizar ovos de estrongilídeos por grama de fezes.

O grupo de animais infetados com TB apresentou uma média de $50 \pm 70,71$ OPG (min 0 - máx. 150), enquanto o grupo de animais não infetados apresentou uma média de $10 \pm 30,51$ OPG (min. 0 - máx.150). A prevalência do grupo de animais positivos a TB foi 50%,

IC_{95%}=15,0-85,0% (2/4 amostras) e a do grupo de animais negativos a TB foi 13,3%, IC_{95%}=5,3-29,7% (4/30 amostras). Relativamente à quantidade de oocistos de *Cryptosporidium* spp. assinalados em esfregaços, tendeu a ser maior no grupo de veados infetados do que no grupo de animais negativos a TB. A prevalência de animais infetados com oocistos de *Cryptosporidium* spp. em animais positivos e negativos a TB foi 25%, IC_{95%}=4,6-69,9% (1/4 animais) e 9,7%, IC_{95%}=3,4-14,9% (3/31 animais), respetivamente.

Tabela 10: Análise multivariada em amostras refrigeradas de veado

Parasita /Teste coprológico	Variáveis Independentes	p	Incidence ratio	95% IC (2,5%-97,5%)
Estrongilídeos /McMaster	Positivo a TB	0,001	5,0	4,18 – 5,97
<i>Cryptosporidium</i> spp. /esfregaço	Positivo a TB	0,001	16,5	9,13 – 31,25

5.2.3 Amostras congeladas (de animais infetados com TB)

As amostras de veado que se encontravam congeladas foram apenas 7, tendo-se obtido 2 testes positivos em 3 amostras: teste de Willis e técnica de Baermann. As prevalências observadas foram: 28,6% para ovos de estrongilídeos, com IC_{95%}=8,2-64,1% (2/7 amostras); 14,3% para ovos de *Strongyloides* sp. e também para larvas L1 do género *Varestrongylus*, com IC_{95%}=2,6-51,3% (1/7 amostras).

6 Discussão

6.1 Parasitas observados nas amostras de Javali

6.1.1 Análise dos fatores de risco

Para esta análise, o intervalo de confiança atribuído foi de 95% e o valor de significância $\alpha=0,05$. Foi verificado que a o condicionamento das amostras fecais é um fator de risco, e que se deve ter em conta, quando se pretende testar amostras fecais para observação de ovos do tipo *estrongilídeo* e oocistos de *coccídias* (Tabela 4 e Gráfico 4). Os ovos do tipo *estrongilídeo*, ao sofrerem descongelação podem roturar, apresentar uma coloração mais desvanecida, perder a mórula e apresentar vacuolização, que impede a sua identificação e, por conseguinte, o seu diagnóstico. A refrigeração é o melhor método de armazenamento de amostras fecais e não tem efeito quantitativo no número de ovos até 120 horas pós-conservação (Nielsen *et al.*, 2010; Schurer, Davenport, Wagner & Jenkins, 2014).

No que diz respeito aos oocistos de *coccídias*, os três fatores ambientais que afetam a viabilidade dos oocistos são: temperatura, humidade e oxigénio, sendo que as temperaturas negativas são letais para estes protozoários (Rind & Brohi, 2001).

Visto que a refrigeração é um fator de risco muito relevante na viabilidade de ovos e oocistos de parasitas, os outros fatores de risco referidos na Tabela 4, foram novamente testados nas amostras frescas e serão discutidos mais adiante.

6.1.2 Amostras refrigeradas

Todas as amostras refrigeradas de javali eram de animais não infetados por TB. Nestes animais observou-se que a prevalência global foi de 100%, coincidindo com estudos anteriores (Medne *et al.*, 2009; Santos, 2013) e contrastando com outros resultados obtidos por Duarte *et al.* (2014) que obteve 29,8% amostras positivas.

Observou-se também, que a coexistência de nemátodes e protozoários foi elevada (79%) (Gráfico 5), valor idêntico ao estudo de Gomes (2009) que verificou também esta associação em suínos em extensivo.

Através do teste de Willis, observaram-se amostras positivas para ovos do tipo *estrongilídeo* (*Hyostrongylus* sp./*Oesophagostomum* sp.), ovos de *Strongyloides* sp. e oocistos de *coccídias*. A prevalência observada para ovos do tipo *estrongilídeo* (P=98%) foi indicativo dum parasitismo intenso, aproximado dos resultados obtidos por Santos (2013) com 100% e de Popielek *et al.* (2010) com 84,5%. Este último autor comparou grupos de javalis de produção em extensivo e javalis numa área florestal, onde os primeiros se encontravam 91,8% parasitados e os segundos 79% com ovos do tipo *estrongilídeo*. Outros estudos tiveram prevalências inferiores entre 59% e 66% (Medne *et al.*, 2009; Allwin *et al.*, 2015; Gassó *et al.*,

2015). Neves (2013) obteve valores ainda mais baixos, 34,8% para jovens, 29,3% para adultos e 0,7% nas idades de javali não identificadas.

Para o presente estudo, o método de flutuação revelou-se um teste muito eficaz para a observação de ovos da subordem Strongylida. A média de ovos por grama de fezes contabilizados, 534 ± 748 OPG (Tabela 5), foi inferior ao resultado obtido por Santos (2013). Neste estudo anterior, é referido que há sobrepopulação de javalis na Tapada de Mafra. Nos locais onde há uma maior densidade populacional é comum haver alimentadores. Estes locais são propícios para a infeção parasitária. Os animais aglomeram-se e defecam nestas zonas onde se alimentam, aumentando a probabilidade de um outro animal se infetar, e consequentemente, aumentar a prevalência de animais positivos na população. No estudo de Popiolek *et al.* (2010) os javalis de produção em extensivo eram alimentados pelo produtor ao longo do ano, e desparasitados duas vezes ao ano, sendo que, apesar de terem uma maior prevalência, também tinham maior contagem de ovos por grama de nemátodes gastrointestinais, comparativamente aos dos javalis da área florestal. Além do acto da suplementação alimentar conduzir à infeção parasitária, devido à maior concentração animal, a densidade de alimentadores também aumenta a facilidade de transmissão dos parasitas gastrointestinais (pois está dependente dum maior encabeçamento), a sua variedade, assim como a maior probabilidade e intensidade de infeção, devido à contaminação dos locais de alimentação com formas parasitárias infectantes (Navarro-Gonzalez *et al.*, 2013).

Em relação à idade, os animais jovens obtiveram prevalências e eliminação de ovos mais elevados comparando com os adultos, o que também foi observado no estudo efetuado por Neves (2013).

Apesar de não ter sido possível comparar as amostras refrigeradas, com a presença/ausência de TB, comparou-se de acordo com o local de origem dos animais, ou seja, provenientes de zonas edafo-climáticas diferentes. Os animais provenientes do Baixo Alentejo (sul do país) encontravam-se dentro da área epidemiológica de risco para TB, enquanto os animais da Lezíria do Tejo eram oriundos duma zona não epidemiológica de risco para TB (centro do país). Os animais da Lezíria do Tejo apresentavam uma excreção média de OPG mais elevada comparativamente com os do Baixo Alentejo (Gráfico 10). Está descrito que a infeção helmíntica induz uma resposta imunitária mediada por linfócitos Th2, regulada por citoquinas, nomeadamente interleucinas IL-4, IL-5, IL-13 que suprimem outras citoquinas como o IFN- γ da resposta imunitária interferida por linfócitos Th1 e responsável pela ação direta às bactérias, vírus e protozoários (Maizels *et al.*, 2004; Jolles *et al.*, 2008; Bordes & Morand, 2010). Os hospedeiros não infetados por *M. bovis* e com contagens de OPG elevadas, têm uma fraca resposta imunitária nas infeções helmínticas, produzindo mais IFN- γ que reforça a imunidade contra microparasitas, pela via dos linfócitos Th1. Já os hospedeiros, com uma imunidade exacerbada sobre os helmintes, apresentam uma fraca resposta de linfócitos Th1 (Ezenwa *et al.*, 2010). Logo, isto sugere que os animais provenientes de área epidemiológica de risco de

TB, ao apresentarem valores mais baixos de OPG, podem ter uma fraca resposta imunitária contra a micobactéria.

Em relação à prevalência de ovos do género *Strongyloides* (P=18,6%), os nossos resultados são próximos dos de Medne *et al.* (2009), que obtiveram 24%. O estudo efetuado por Gomes (2009), em explorações de suínos em extensivo, obteve uma prevalência ligeiramente superior (29%); sendo que o grupo “Reprodutores” e “Recria” tinham valores semelhantes ao nosso trabalho, 14% e 22%, respetivamente. Outro estudo obteve resultado mais elevado, em que mais de 50% dos animais foram positivos a este género (Allwin *et al.*, 2010). Este tipo de parasita foi mais incidente em javalis de idade inferior a dois anos, provavelmente, porque é transmitido horizontalmente e porque o sistema imunitário dos leitões, ainda não é totalmente eficaz (Roefstorff & Nansen, 1998).

Os oocistos de coccídias observados pertenciam à família Eimeriidae, mas infelizmente não foi possível identificar a sua espécie, uma vez que todos os oocistos não se encontravam esporulados, à semelhança de outros trabalhos efetuados em Portugal (Santos, 2013). Morfologicamente, é possível diferenciar *Eimeria* spp. de *Cystoisospora suis* a partir do processo de esporogonia, sendo estas as coccídeas mais comuns do javali (Neves, 2013). O género *Eimeria* diferencia-se pelo oocisto que é composto por quatro esporocistos, cada um com dois esporozoítos; enquanto o género *Cystoisospora* apresenta-se com dois esporocistos com quatro esporozoítos em cada um (Bowman, 2014). Uma das razões pelas quais os oocistos não estavam esporulados, foi a colheita da amostra ter sido efetuada através do intestino e do reto do animal. A esporulação de oocistos desta família efetua-se durante a sua vida exógena (Rind & Brohi, 2001). No trabalho de Neves (2013) foi obtido um resultado aproximado nas explorações de javalis jovens, com uma prevalência de 26,1% e em adultos e animais com idade diferenciada, a prevalência foi 1,5% e 92,9%, respetivamente. No estudo de Calado (2009) foi obtido uma prevalência mínima de 2% de javalis positivos. Outros trabalhos referidos no presente estudo obtiveram valores muito superiores (Medne *et al.*, 2009; Gomes, 2013; Santos, 2013). Relativamente ao local, observou-se que os animais do Baixo Alentejo tinham maior percentagem de animais positivos a este protozoário do que os animais da Lezíria do Tejo. Os javalis do Baixo Alentejo são provenientes de uma área epidemiológica de risco de TB, e ao apresentarem uma maior prevalência de oocistos de coccídias podem revelar que a resposta imunitária dirigida a estes protozoários (mediada por Th1) não é muito eficaz. Estes animais são provenientes da área epidemiológica de risco a *M. bovis*, podendo estar mais suscetíveis a esta micobactéria, porque a resposta imunitária é realizada pela mesma via que os protozoários, ou seja, por linfócitos Th1.

Através da análise multivariada na família Eimeriidae, foi verificado que os animais jovens tendem a estar mais parasitados do que os adultos. De facto, os animais da camada mais jovem são hospedeiros de coccídias, apresentando uma descarga contínua de oocistos. Já os adultos convertem-se em portadores e disseminadores, sendo frequente nestes, mas com

cargas parasitárias mais baixas por terem desenvolvido imunidade a este agente. Os javalis do Baixo Alentejo têm maior probabilidade de excreção de oocistos do que os da Lezíria do Tejo. É preciso salientar que o número de amostras positivas é pequeno, e que apenas foi observado um javali adulto positivo a coccídias proveniente do Baixo Alentejo e com uma excreção de oocistos muito elevada, de forma que esta situação pode ter influenciado este resultado, tal como reportado por outros autores (Ellis, 2010).

Foi observado que quer o sexo feminino, quer os animais jovens, apresentam uma maior eliminação de ovos do tipo *estrongilídeo*, contudo o rácio de incidência destes dois grupos não foi muito elevado (Tabela 8). Em suínos, os *estrongilídeos* como por exemplo o género *Oesophagostomum* e o *Hyostrongylus*, são frequentemente encontrados em suínos reprodutores, que apresentam, também, com maior intensidade de infeção, refletindo a propensão deste tipo de parasita para a indução de baixa imunogenicidade (Nansen & Roepstorff, 1999). Nas explorações de produção biológica de suínos (onde não é permitido a profilaxia com anti-helmínticos, sendo por isso muito aproximadas em termos de manejo a zonas com javalis) as fêmeas peri-parturientes apresentam uma elevação significativa de eliminação de ovos que pode durar durante todo o período de lactação. No entanto, esse aumento pode ser inconstante ou pode nem ocorrer. Já os animais desmamados adquirem níveis de infeções mais elevados, que vão aumentando com a idade (Nansen & Roepstorff, 1999). Talvez a intensidade de eliminação destes parasitas tenha sido mais evidente em jovens, pela ovopostura inconstante das populações de *estrongilídeos* dos javalis adultos devido, provavelmente, a uma infeção crónica.

O método de sedimentação é um teste qualitativo utilizado para se observar ovos de parasitas densos e pesados, que se depositam no fundo do tubo de ensaio pela força da gravidade. Com este teste foi possível a identificação de ovos de *Metastrongylus* spp., com L1 no seu interior, um helminte muito importante que afeta os pulmões dos suínos (Roepstorff & Nansen, 1998). No presente estudo, este parasita pulmonar esteve presente em 34,9% das amostras, resultado semelhante a outros estudos onde se observou o parasita adulto (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2013; Yagoob *et al.*, 2014; Bruno de Sousa *et al.*, 2004). Houve estudos com valores superiores como Santos (2013) e Neves (2013), mas o primeiro autor refere que as amostras colhidas representaram uma pequena quantidade, podendo não corresponder à realidade.

Noutros estudos onde se observaram ovos de *Metastrongylus* spp., Duarte *et al.* (2014) obtiveram uma prevalência de 17,5% e Neves (2013) também obteve uma prevalência inferior nos javalis selvagens. No presente trabalho, a prevalência global de *Metastrongylus* spp. deveria ter sido mais elevada, visto que estes animais não se encontravam confinados, tendo mais oportunidade de recorrer ao hospedeiro intermediário (anelídeos, como é o exemplo das minhocas) (Popiolek *et al.*, 2010), pela ausência de desparasitação e pela maior longevidade (Neves, 2013). Provavelmente esta prevalência deveu-se ao facto da grande percentagem dos animais observados terem sido adultos (75,9%). Apesar disso, os javalis mais infetados

foram os mais jovens, resultado observado noutros estudos (Gomes, 2010; García-González *et al.*, 2013; Duarte *et al.*, 2014). Nesta idade, os animais têm necessidades proteicas que são compensadas pela ingestão de anelídeos. São animais mais suscetíveis a este parasita, por ainda não terem adquirido uma resposta imunitária eficaz, enquanto os adultos apresentam imunidade adquirida após o primeiro contacto com o parasita (Gomes, 2010). García-González *et al.* (2013) constataram que *Metastrongylus* spp. é encontrado em maior número em locais de grande altitude (>451m) e em áreas com maior precipitação (>501L/m²). Os animais mais afetados eram do Baixo Alentejo, da zona de Barrancos, provavelmente por ser um local com alguma altitude (400-600 m).

Os nemátodes do género *Trichuris*, nomeadamente *Trichuris suis*, são parasitas típicos dos suínos domésticos e silvestres, quer pelo seu ciclo de vida monóxeno, quer pela resistência dos seus ovos no ambiente, o que os torna facilmente difundidos e frequentemente reportados. Neste trabalho, a sua prevalência foi baixa, semelhante a estudos anteriores (Medne *et al.*, 2009; Popiolek *et al.*, 2010; Neves, 2013). Bruno de Sousa *et al.* (2004) observaram o parasita adulto em 12,5% em javalis e Gomes (2009) observou 24 explorações suínas de raça alentejana, em que a prevalência global de ovos de *Trichuris* sp. foi 17%, observando apenas no lote de recrias. Outros estudos tiveram resultados discrepantes, facto ocorrido no de Calado (2009) com 2% e no de Allwin *et al.* (2015) com 70%. *T. suis* é mais frequente em parques confinados, com condições higio-sanitárias deficientes sendo mais presente em animais de tenra idade, por terem características imunogénicas altas (Nansen & Roepstorff, 1999).

Ascaris suum é um parasita comum a todos os sistemas de produção de suínos domésticos e silvestres, por ter um ciclo monóxeno, pela resistência dos seus ovos de casca dura, que lhes confere proteção contra a dessecação e até mesmo produtos químicos utilizados na desinfecção (Roepstorff & Nansen, 1998). Assim como *T. suis*, *Ascaris suum* afeta mais a camada jovem de javalis pelas suas propriedades imunogénicas, facto verificado nas duas amostras positivas. Observou-se uma prevalência baixa comparativamente a outros estudos (Gassó *et al.*, 2015; Medne *et al.*, 2009). Na Polónia, um estudo observou ovos de *A. suum* em 15,5% das amostras totais de javali, obtendo uma maior percentagem nos javalis que se encontravam em cativeiro, comparando com os silvestres, 25,9% e 1,6%, respetivamente (Nosal *et al.*, 2010). Gomes (2009) obteve uma prevalência de 25% para suínos de raça alentejana em extensivo, em que o grupo “recria” apresentava 22%, onde se observou maior expressividade. O nível de infeção deste parasita pode aumentar em javalis de montados, se for influenciado pelas atividades de gestão cinegética, que passam pela suplementação alimentar dos javalis, durante os meses em que o alimento é escasso. Por conseguinte, há concentrações de animais nos comedouros, aumentando o contato direto entre eles e aumento de animais positivos a este parasita (Duarte *et al.*, 2014). Considerando estes fatores, é natural que a presença deste parasita nos javalis observados tenha sido baixa.

Assim como para *Trichuris* sp., quando o animal tem o primeiro contato com *Ascaris* sp., a resposta imunitária desenvolvida protege-o de uma reinfeção (Duarte *et al.*, 2014).

O parasita *Physocephalus sexalatus* foi encontrado apenas numa amostra (2%). Um estudo realizado por Popielek *et al.* (2010), obteve uma prevalência de 1,6% para javalis silvestres e 2,3% para javalis em cativeiro, semelhante ao presente estudo. Contrariamente, Gomes (2009) obteve valores mais elevados (25%) em suínos de raça alentejana em produção extensiva. Os nemátodes da família Spiruridae, como é o caso de *Physocephalus sexalatus* e de *Ascarops strongylina*, por terem um ciclo de vida indireto, nomeadamente por apresentarem insectos como HI, é mais comum ser assinalado em suínos silvestres, como o javali, ou em sistemas de criação de suínos em extensivo (Nansen & Roepstroff, 1999).

A *Fasciola hepatica* é um parasita importante em saúde pública, dado a sua componente zoonótica. A epidemiologia é influenciada pela água, fundamental para o miracídio nadar até encontrar o hospedeiro intermediário, o caracol, nomeadamente da espécie *Galba truncatula*, a partir do qual emanam as cercárias que enquistam no ambiente como metacercárias, sendo estas as formas infectantes ao serem ingeridas pelos javalis, quando pastam em zonas húmidas e de regadio (Nansen & Roepstroff, 1999; Calado, 2009). Os ovos de *Fasciola hepatica* foram encontrados em 7% dos animais, todos provenientes da Lezíria do Tejo. Realmente, esta é uma zona conhecida pelas suas lezírias, ideais para a agricultura de regadios, ambiente propício para o parasita e para o seu hospedeiro de intermediário. No Baixo Alentejo, zonas húmidas e regadios são mais escassas. A baixa deteção de ovos nas fezes de animais infetados com formas adultas nos ductos biliares demonstra que, nos casos de infeção crónica, a libertação dos ovos não se dá ou é muito reduzida, sugerindo que não há deteção por técnicas coprológicas (Mezo *et al.*, 2013). Provavelmente, esta é a razão pela qual não se observa uma grande percentagem neste trabalho.

Relativamente a outros protozoários com menor expressão, observou-se a presença de *Balantidium coli* e *Cryptosporidium* spp. e ausência de *Giardia* sp.

Os javalis são hospedeiros naturais de *Balantidium* sp., contudo a taxa de infeção deste protozoário foi baixa comparado com outros estudos (Neves, 2013; Gomes, 2009). Neves (2013) obteve valores mais elevados nos adultos do que nos jovens javalis, apesar de não ter encontrado uma grande diferença. Um estudo semelhante à presente dissertação e com resultados aproximados, verificou que os animais positivos correspondiam a fêmeas (Duarte *et al.*, 2014). No nosso trabalho, o único animal positivo era juvenil proveniente da Lezíria do Tejo. O contato social entre fêmeas e jovens poderá explicar o facto da elevada taxa de infeção, ao passo que, os machos são seres solitários, que só se reúnem na altura do acasalamento. Neves (2013) refere ainda, que a presença doutros parasitas como os da família Eimeriidae, *Oesophagostomum* spp., *T. suis*, a presença de bactérias ou vírus, o stress e a fome, são fatores concomitantes que podem facilitar o parasitismo por *Balantidium* sp. De certa forma, o único animal que se encontrava parasitado, também apresentava ovos de *T.*

suis, do tipo estrongilídeo e oocistos da família Eimeriidae. Sabe-se que os quistos deste parasita sobrevivem diversos dias dentro de água, por isso ser importante o seu valor zoonótico e epidemiológico. Mas neste caso, e para as amostras e zonas envolvidas no trabalho, não parece ser preocupante.

A prevalência de 69,8% para *Cryptosporidium* spp. no presente trabalho foi elevada quando comparada com a de estudos anteriores, em que utilizaram a técnica de imunofluorescência direta (Castro-Hermida, García-Presedo & González-Warleta, 2011; Duarte *et al.*, 2014). Castro-Hermida *et al.* (2011) pesquisaram este protozoário e *Giardia* sp. em corços (*Capreolus capreolus*) e javalis na época venatória 2008-2009 na Galiza, Espanha. Nestes javalis, a prevalência foi 7,6% para *Cryptosporidium* spp. e 1,3% para *Giardia*. de acordo com os nossos resultados, a prevalência de *Cryptosporidium* spp. foi mais elevada nos machos juvenis do que nos machos adultos, mas sem diferença significativa em relação à idade e ao sexo. *Cryptosporidium* spp. é um protozoário muito importante em saúde pública por ser observado em javalis assintomáticos, sugerindo ser um reservatório natural deste parasita. Desta forma, o javali contribui potencialmente como uma fonte de infeção de animais domésticos e humanos, através do abastecimento de água contaminada com os seus oocistos (Castro-Hermida *et al.*, 2011; Nemejc *et al.*, 2013). É um parasita que necessita da água para a sua disseminação, e a ausência de tratamento farmacológico eficaz e a resistência dos oocistos na água tratada auxiliam esse processo (Duarte *et al.*, 2014). No presente estudo, foi evidenciado que a intensidade de excreção de oocistos tende a ser maior nos animais jovens do que nos adultos, assim como no sexo feminino comparativamente com o sexo masculino, com significado estatístico extremamente notório. Este resultado foi comparável a outros estudos, no que diz respeito à idade do animal (Nemejc *et al.*, 2013; Castro-Hermida *et al.*, 2011). A prevalência observada foi de 85,7% (6/7) para jovens e 50,0% (11/22) para adultos, sendo que um dos animais positivos era macho e cinco eram fêmeas. Apesar da maioria das fêmeas serem adultas, estas formam grupos sociais e estão em contato com os mais jovens e por isso acabam por se reinfetar.

No teste de coprocultura em copo, para a identificação de larvas L3 de javalis apenas se observou o género *Oesophagostomum*. Este facto foi comum a estudos anteriores (Gomes, 2009; Santos, 2013). Santos (2013) observou que *Oesophagostomum* sp. era o género mais prevalente em relação a *Hyostrogylus* sp. Contudo, o rendimento larvar obtido no nosso trabalho foi muito reduzido comparado com o deste estudo anterior.

6.1.3 Amostras congeladas

Comparando este grupo de amostras com o anterior, notou-se uma discrepância relativamente ao número de animais que se encontrava parasitado.

O teste de McMaster foi negativo, quer para ovos, quer para oocistos, devido ao fato de terem sido congeladas a -18°C , a cristalização que ocorre durante a congelação promove a destruição de formas parasitárias e interrompe mecanicamente os ovos do tipo estrongilídeos de flutuar (Schurer *et al.*, 2014), podendo mascarar os resultados nos testes coprológicos. Os oocistos de *Cryptosporidium* spp. também não foram observados. Ainda assim, *Cryptosporidium* spp. pode reter a sua infecciosidade durante meses e resistir a factores ambientais desfavoráveis com mais facilidade do que muitos agentes patogénicos por causa da sua dura parede protetora (Fayer & Nerad, 1996). Foram realizados vários estudos para averiguar a sobrevivência de oocistos em determinados fatores ambientais que podem diminuir a sua taxa de infeção. Robertson, Campbell e Smith (1992) isolaram oocistos de *Cryptosporidium parvum* e colocaram-nos em vários ambientes de pressão, como o tratamento de água, dessecação e congelação; e em ambientes físicos, como fezes e vários tipos de água. Verificou que a dessecação era fatal para os oocistos, mas que uma pequena percentagem conseguiu suportar temperatura de -22°C por 775 horas. Um outro estudo colocou *C. parvum* purificado em microtubos com água destilada e armazenou-os a 5°C durante 168 horas, outros foram congelados a -10 , -15 , -20 e -70°C de 1 a 168 horas e descongelados à temperatura ambiente (21°C). Foram, então, administrados por via gastrointestinal 50 microlitros contendo oocistos em ratos e passado 72 ou 96 horas foram observadas histologicamente, secções de tecido provenientes do íleo, ceco e cólon. Relativamente aos resultados dos ratos que receberam oocistos congelados a -20°C por 1,3h e 5h observou-se desenvolvimento de estádios do parasita em todos os ratos. Um rato apenas, que recebeu oocistos congelados a -20°C por 8h estava positivo e os restantes que receberam oocistos a -20°C por 24 e 168 horas, não tinham parasitas (Fayer & Nerad, 1996). Visto que, as amostras do presente estudo estavam congeladas há, pelo menos, um ano, é natural não terem sido observados oocistos e ovos nestas amostras, considerando a existência de falsos negativos.

Nas 16 amostras de animais não infetados por TB observou-se apenas três tipos de espécies de parasitas: estrongilídeos, *Fasciola hepatica* e *Ascaris suum*, que em comparação com as amostras frescas, a percentagem de ovos do tipo estrongilídeo foi baixa. Nas 24 amostras de animais infetados por TB observou-se quatro grupos de parasitas: estrongilídeos (*Hyostrongylus* sp./*Oesophagostomum* sp.), *Metastrongylus* spp., *Balantidium* sp. e coccídias. A presença de *M. bovis* nestes animais pode indicar que a sua resposta imunitária mediada por linfócitos Th1 é fraca, podendo levar a uma infeção por parte de outros agentes bacterianos, virais e protozoários. Esta fraca resposta imunitária pode dever-se ao fato destes

animais estarem mais parasitados por helmintes e estes terem a capacidade de suprimir a resposta imunitária contra microparasitas.

Apesar de não ter havido uma relação significativa entre hospedeiro, parasitas e a presença de TB, verificou-se que a infeção por *Metastrongylus* spp. foi numericamente diferente entre o grupo de animais positivos a TB (todos provenientes do Baixo Alentejo) e o grupo de animais negativos a TB (todos provenientes da Lezíria do Tejo), sugerindo que os animais infetados por *Metastrongylus* spp. teriam mais probabilidade de se encontrarem infetados com TB (Risco, 2014). A metastrongilose é uma doença parasitária que afeta as vias respiratórias inferiores, causando dispneia e perda de peso progressiva; em casos graves, causa broncopneumonia verminosa (Neves, 2013) e imunodepressão moderada a grave (Gassó *et al.*, 2014). Possivelmente, poderá ter sido o que ocorreu nestes animais, ainda que o tamanho da amostra não fosse suficientemente grande para um maior poder do teste estatístico (Ellis, 2010).

6.2 Parasitas observados nas amostras de Veado

Nos artigos pesquisados, foi observado que poucos autores analisaram amostras de fezes de veados, recorrendo maioritariamente à necrópsia e à observação do trato intestinal. Apesar disso, a prevalência global de parasitas foi equiparável com alguns (Valcárcel *et al.*, 2002); inferior a outros (Santín-Durán *et al.*, 2004; Santín-Durán *et al.*, 2008; Martín-Hernando *et al.*, 2007; Davidson *et al.*, 2014) e superior a outros estudos (Kusak *et al.*, 2012). No que diz respeito aos trabalhos que precederam o presente estudo, a prevalência global foi equiparável à reportada por Santos (2013) e inferior à de Medne *et al.* (2009). Provavelmente, esta prevalência teria sido maior, caso todas as amostras fossem refrigeradas, ainda que das 41 amostras analisadas, apenas 7 se encontravam congeladas.

6.2.1 Análise dos fatores de risco

Na análise estatística foram avaliados vários fatores de risco, entre eles, a conservação da amostra, a idade, a presença/ausência de TB e o sexo do animal (Tabela 9). A congelação da amostra está relacionada, de forma estatisticamente significativa, com a deteção de ovos do tipo estrongilídeo, sendo que há menos 85,5% de probabilidades, de se encontrarem parasitas nas amostras congeladas, comparativamente com as refrigeradas. De facto, como já foi referido anteriormente, os ovos tipo estrongilídeo são sensíveis à temperatura combinada com a duração, e por isso, é difícil observá-los ao microscópio, uma vez que perdem a sua estrutura e podem não flutuar (Nielsen *et al.* 2010; Schurer *et al.*, 2014).

6.2.2 Amostras refrigeradas

As amostras refrigeradas eram provenientes de veados infetados e não infetados com TB. Em comparação com os javalis, os veados apresentavam uma menor carga parasitária, observando que 14,7% (5/34 amostras) foram negativos aos testes coprológicos (Gráfico 11). Nestas amostras, a percentagem de amostras positivas ao teste de Willis foi equivalente a estudos anteriores (Medne *et al.*, 2009; Santos, 2013). No que diz respeito à média de OPG, o presente estudo foi semelhante a outros (Santos, 2013; Kowal *et al.*, 2014).

O género *Eimeria* foi o segundo parasita mais prevalente (17,6%) (Gráfico 12). Kowal *et al.* (2014) obteve 33,3%, mas o número de animais foi pequeno, esperando obter valores mais elevados relativamente à zona de onde eram os veados. Ramajo-Martin *et al.* (2007) fez um estudo em Espanha obtendo um valor semelhante ao presente estudo, e observou que muitas espécies de *Eimeria* encontradas em veados são partilhadas com pequenos ruminantes domésticos, nomeadamente, cabra e ovelha. Nas explorações de ruminantes domésticos, a coccidiose por *Eimeria* spp. causa perdas económicas, os animais têm sinais clínicos de diarreia aquosa profusa, desidratação, fraqueza, falta de apetite e perda de peso (Díaz *et al.*, 2010).

A presença de *Eimeria* spp. em ruminantes selvagens é largamente conhecida, mas não existe muita informação sobre os efeitos nefastos na dinâmica das populações por ter pouco significado clínico (Ramajo-Martín *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2007; Trogu, 2015).

Díaz *et al.* (2010) fizeram um estudo no noroeste de Espanha, em ruminantes domésticos (ovino e bovino) de explorações de regime extensivo e silvestres (corços) de modo a conhecer a prevalência e a intensidade da excreção de oocistos e as espécies implicadas. Foram recolhidas 906, 1882 e 360 amostras fecais de ovinos, bovinos e corços, respetivamente. Os ovinos foram os que tiveram maior prevalência e intensidade de eliminação de oocistos (74%, 1396 ± 10370 OoPG) e os bovinos os mais baixos (32%; 42 ± 87 OoPG). Os corços tiveram 38% de amostras positivas, com uma média de 870 ± 2344 OoPG. Foram encontradas 8 espécies de *Eimeria* nos bovinos, 9 nos ovinos e nos corços 7 espécies. Ainda foi verificado que os animais mais jovens têm maior prevalência de *Eimeria* spp. do que os adultos, em todos os grupos de ruminantes. Com este estudo, mostraram que este parasita é generalizado em ruminantes, e apesar de ser responsável por perdas económicas em gado, também é uma influência negativa sobre a sobrevivência de corços no seu ambiente natural, sendo que a sobrepopulação pode levar a ocorrência de surtos com taxas de mortalidade altas em corços jovens.

Um outro estudo envolvendo três espécies de ruminantes silvestres provenientes da parte noroeste dos Alpes, como camurças (*Rupicapra rupicapra rupicapra* - capríneo dos Alpes), veados e corços, foram recolhidas 414 amostras fecais com o objetivo de conhecer o papel epidemiológico do género *Eimeria*. As camurças obtiveram uma prevalência de 81,1% (137/169), os veados 46,1% (78/169) e os corços 43,4% (33/76). Estes dados não sugeriram

qualquer impacto na dinâmica populacional no que diz respeito a coinfeções de *Eimeria* spp. e nemátodes gastrointestinais (Trogu, 2015). Medne *et al.* (2009) e Kusak *et al.* (2012) obtiveram prevalências mais baixas do que o presente estudo. A prevalência de *Eimeria* spp. poderá também ter sido mais baixa na nossa investigação quando comparada com a restante bibliografia consultada, porque nas amostras de veados a grande maioria eram adultos com 82,4% de predominância (28/34 animais), os quais são menos afetados à infecção por este grupo de protozoários.

A prevalência do género *Strongyloides* também vai ao encontro do intervalo obtido pelo estudo efetuado na Letónia (Medne *et al.*, 2009).

Os géneros *Moniezia*, e *Fasciola* foram observados numa amostra e *Trichuris* spp. numa outra, em que as duas eram positivas a TB.

A espécie *Moniezia benedini* foi identificada na única amostra positiva. Este céstode é transmitido ao hospedeiro definitivo, através de hospedeiros intermediários, ácaros pertencentes, maioritariamente à família *Oribatidae*. A incidência da infeção é mais recorrente em jovens e mais evidente no verão, relacionado com períodos ativos do ácaro em áreas temperadas (Taylor, 2007). Apesar da grande maioria da bibliografia consultada ter recorrido à necrópsia para visualização e identificação de parasitas, observou-se a também a presença desta espécie através de coprologia (Garcia-Romero *et al.*, 2000; Ramajo-Martín *et al.*, 2007). O estudo de Medne *et al.* (2009) observou o mesmo género, apresentando uma prevalência aproximada do presente trabalho.

A *Fasciola hepatica* é típica de zonas húmidas ou com microhabitats húmidos, devido à maior presença de hospedeiros intermediários, tendo uma prevalência mais elevada no outono. A prevalência obtida foi muito baixa, provavelmente, porque a zona do Baixo Alentejo onde efetuámos o nosso trabalho é pouco húmida, apesar das amostras terem sido colhidas no final do outono, que é a altura do ano em que há mais humidade. A prevalência de *Fasciola hepatica* também foi equiparável ao trabalho de Medne *et al.* (2009) e identificada recentemente em veado noutro estudo em Portugal (Santos, 2013). Já a prevalência do género *Trichuris* foi equiparável ao estudo de García-Romero *et al.* (2000) e inferior ao de Valcárcel *et al.* (2002).

No presente estudo, a prevalência de *Cryptosporidium* spp. foi baixa (11,8%). Trogu (2015) analisou em 561 amostras fecais de ungulados silvestres residentes nos Alpes, a presença da *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* sp., através do kit comercial ELISA. A prevalência de *Giardia* foi de 4,5% (11/246), 2,5% (5/196) e 8,4% (10/119), enquanto as prevalências de *Cryptosporidium* spp. foram mais baixas, 1,2% (3/246), 0,5% (1/196) e 3,4% (4/119), para camurças, veados e corços, respetivamente. É razoável pensar que, a espécie de *Cryptosporidium* observada nos veados estudados da presente tese seja o *Cryptosporidium parvum*, por ser a espécie mais assinalada em veados (Taylor *et al.*, 2007). *C. parvum* tem carácter zoonótico e tem sido isolado quer em animais domésticos como silvestres. A pressão

antrópica pode causar distúrbios nas populações cinegéticas, como, por exemplo, a ação do homem através da caça. Apesar disso, no presente estudo, os veados tiveram uma baixa prevalência de *Cryptosporidium* spp., podendo sugerir que estes animais têm uma maior resiliência ao impacto das atividades humanas. Castro-Hermida *et al.* (2011) investigaram *Cryptosporidium* sp. e *Giardia* sp. em javalis e corços, obtendo prevalências inferiores em corços relativamente aos javalis, podendo estar relacionado com o tipo de dieta.

Quanto aos resultados obtidos relativamente aos protostrongilídeos, estes são parasitas da superfamília *Metastrongyloidea* e são achados comuns em veados. Dependendo da espécie do parasita, as patologias causadas mudam consoante o local onde se encontra o parasita. Os parasitas encontrados através da técnica de Baermann foram: *Elaphostrongylus* sp. (parasita pulmonar, muscular e do sistema nervoso) e *Varestrongylus* sp. (parasita pulmonar). *Elaphostrongylus cervi* afeta os pulmões, o sistema nervoso central e a musculatura esquelética, enquanto *Varestrongylus sagittatus* apenas afeta os pulmões. Os protostrongilídeos adultos fêmeas de *E. cervi* e *V. sagittatus* libertam os ovos no tecido fascial do músculo esquelético e nos pulmões, respetivamente. Após a incubação dos ovos, nos pulmões, as larvas migram através das vias aéreas até à faringe, são deglutidas e passam através das fezes (Vicente, Fierro & Gortazar, 2005; Taylor *et al.*, 2007; Panayotova-Pencheva *et al.*, 2011). É desta forma que as larvas L1 destes parasitas são detetadas pelas técnicas coprológicas.

As prevalências destes protostrongilídeos não foram muito elevadas (26,5% e 11,8% para o género *Elaphostrongylus* e *Varestrongylus*, respetivamente), comparando com estudos anteriores (Bruno de Sousa *et al.*, 2004; Morandi *et al.*, 2006; Panayotova-Pencheva, 2011). Num estudo foram analisadas as dinâmicas sazonais da excreção fecal da larva do 1º estágio de *E. cervi* em veados do sul de Espanha durante três anos. Apurou-se que as menores taxas de intensidade média de L1 foram encontradas no verão, não havendo nenhuma variação sazonal na prevalência e as maiores taxas de infeção parasitária observaram-se no período húmido. A intensidade mensal da excreção foi mais positivamente associada à precipitação precoce do que à precipitação do mesmo mês, como forma de adaptação ao clima mediterrâneo e, assim, melhorar a sua oportunidade de transmissão (Vicente *et al.*, 2005). Morandi *et al.* (2006) observaram que os veados mais infetados por *Elaphostrongylus* sp. foram em veados adultos. Apesar do nosso trabalho ter tido 88% de veados adultos e das amostras fecais terem sido recolhidas na época húmida, a percentagem destes protostrongilídeos foi baixa. Alguns fatores desta baixa prevalência podem dever-se ao facto de as formas parasitárias não serem detetáveis, porque *Elaphostrongylus* spp. apresenta um período pré-patente (desde a penetração do parasita até ao aparecimento das primeiras formas parasitárias detetáveis) que pode ir até aos 125 dias; ou então, por a produção de larvas ser baixa e a libertação de ovos intermitente (Presidente, 1993). Além disso, a prevalência e a intensidade da excreção de L1 de *Elaphostrongylus* spp. varia inversamente

à condição física, que inclui o estado nutricional e a capacidade imunitária do hospedeiro definitivo (de Mera, 2007). Vicente, Höffee, Fernández-De-Mera e Gortazar (2007) analisaram infecções de microparasitas (TB) e macroparasitas (*Elaphostrongylus* spp.) em diferentes populações de veados, onde se fazia gestão da condição física, agregação e densidade de animais pela suplementação alimentar. Observou que a presença individual de tuberculose bovina estava positivamente associada à densidade do hospedeiro, enquanto a presença de *E. cervi* estava negativamente relacionada com a densidade do hospedeiro e o aumento da condição corporal. Desta forma, este resultado sugere que o aumento da densidade populacional aumenta o contacto entre animais, inclusive de outros ungulados, aumentando o risco de transmissão direta de TB, mas não de *Elaphostrongylus cervi* (Santos, 2010). No estudo de Kusak *et al.* (2012), a prevalência de *E. cervi* foi inferior ao presente trabalho, sugerindo que uma das causas da baixa prevalência se deveu à baixa densidade populacional, que contradiz o estudo de Vicente *et al.* (2007).

A intensidade média de larvas infetantes L3 foi baixa, o rendimento foi de 55,29%, tendo sido observados os géneros *Ostertagia* e *Oesophagostomum*, que foram identificados noutros estudos onde se observou os parasitas adultos através de necrópsia (Santín-Durán *et al.*, 2008; Kusak *et al.*, 2012; Davidson *et al.*, 2014) e por coprocultura em copo, onde se observaram as larvas L3 (Santos, 2013).

Nas amostras refrigeradas, observou-se que os animais positivos a TB apresentavam prevalências mais elevadas de parasitas do que os animais negativos a TB (Gráfico 9). Sabe-se que a imunossupressão associada a nemátodes pode ter fortes efeitos na suscetibilidade de TB em animais não infetados, promovendo a manutenção da doença tuberculosa (Ezenwa & Jolles, 2011; Risco *et al.*, 2014).

Através da análise de regressão de Poisson registou-se uma associação positiva entre a intensidade de eliminação de ovos do tipo estrongilídeo e os animais positivos a TB. Estes animais podem estar numa fase mais avançada da doença tuberculosa, levando a supressão do sistema imunitário. Estudos anteriores, verificaram que os animais negativos a TB com maior número de OPG tinham níveis basais de IFN- γ mais elevados, sugerindo uma resposta imunitária direcionada a microparasitas, feita pelos linfócitos Th1 (Jolles *et al.*, 2008; Ezenwa *et al.*, 2010). Ezenwa *et al.* (2010) além de observar o facto anterior referido, observou também que o tratamento anti-helmíntico feito em búfalos aumentou os níveis basais de IFN- γ , demonstrando que a exposição do hospedeiro a nemátodes altera a imunidade de linfócitos Th1. Contudo, há helmintes que têm a capacidade de inibir as duas vias de respostas imunitárias (mediada por Th2 e por Th1) (Maizels *et al.*, 2004), aumentando a possibilidade dos nemátodes, protozoários e micobactérias invadirem o hospedeiro e se reproduzirem.

A quantidade de *Cryptosporidium* spp. em animais positivos a TB foi superior à dos animais negativos a TB. Este protozoário é considerado um microparásita, assim como *Mycobacterium bovis*, por isso é razoável haver uma maior concentração de *Cryptosporidium* spp. em animais

positivos a TB, uma vez que resposta imunitária para estes dois agentes patogénicos é feita por linfócitos Th1 e que nestes animais esta resposta imunitária é fraca.

Contudo, apesar dos resultados observados, a amostra de animais positivos a TB era muito reduzida (4 amostras) em comparação com a amostra do grupo de veados negativos a TB (30 amostras), por isso estas comparações e correlações referidas neste parágrafo, podem não corresponder à realidade (Ellis, 2010).

6.3 Amostras congeladas

Estas amostras congeladas são amostras de animais infetados com TB. As amostras permaneceram em congelação durante um ano, sendo que as prevalências observadas foram mais baixas do que das amostras refrigeradas, podendo sugerir a presença de falsos negativos nestas amostras. Relativamente às larvas L1 que foram identificadas numa amostra, estas pertenciam ao género *Varestrongylus*, sugerindo que este género de parasita tem a capacidade de conservação a longo prazo. Também foi observado que as fezes desta amostra estavam mais bem conservadas em comparação com as outras, que se apresentavam mais húmidas e apresentavam odor intenso. Além disso, as larvas L1 dos protostrongílideos conseguem sobreviver a baixas temperaturas (Shostak & Samuel, 1984; Lorentzen & Halvorsen, 1986).

7 Conclusão

Com este trabalho foi possível observar que a presença, variedade e intensidade de parasitas gastrointestinais em ungulados silvestres (javali e veado) de zonas edafo-climáticas diferentes são distintas.

Ficou confirmado que o condicionamento das amostras é algo em ter em conta, para uma boa observação e identificação de endoparasitas. Constatou-se que os ovos do tipo estrongilídeo e oocistos de coccídias são sensíveis às diferenças de temperatura e à duração do tempo de conservação. No javali e no veado, a probabilidade de encontrar ovos do tipo estrongilídeo nas amostras refrigeradas é 78 vezes maior e 6,9 vezes maior, respetivamente, do que nas amostras congeladas. Conclui-se assim que a refrigeração das amostras é o melhor método para realização da coprologia destes ungulados silvestres. Por esta razão foi importante separar as amostras fecais em dois grupos distintos para melhor interpretação.

A grande maioria dos animais encontrava-se parasitada, sendo que os javalis em comparação com os veados apresentavam prevalências mais elevadas de parasitas.

Nas amostras refrigeradas de javali, a coinfeção de nemátodes e protozoários foi de 79% de prevalência, confirmando que na vida selvagem a presença de vários tipos de parasitas num hospedeiro é comum criando um equilíbrio com o parasitismo. Nos javalis, os parasitas mais assinalados foram estrongilídeos (*Hyoststrongylus* sp./*Oesophagostomum* sp.) (97,7%), género *Metastrongylus* spp. (34,9%), coccídias (30,2%), revelando que o teste de Willis é o mais indicado para visualização de ovos da ordem Strongylida.

Relativamente ao local, os javalis da Lezíria do Tejo apresentavam maior prevalência e intensidade de parasitismo do que os do Baixo Alentejo, no que diz respeito a ovos do tipo estrongilídeo. As lezírias são zonas muito húmidas e com vegetação abundante e rasteira, ideais para a maioria dos parasitas gastrointestinais completar o seu ciclo de vida. Em termos de resposta imunitária, estes animais não infetados por TB que têm uma contagem de OPG elevada, têm níveis basais mais elevados de interferão gama, uma citoquina que reforça a resposta imunitária contra micobactérias.

Fasciola hepatica foi o parasita detetado apenas nos javalis da Lezíria do Tejo, local propício ao seu desenvolvimento e propagação. Apesar da prevalência ter sido baixa, é muito provável que o javali seja um contribuidor para a fasciolose dos animais domésticos desta região (em particular os ruminantes) ao contribuir para a contaminação do ambiente.

Em relação a outros parasitas, *Metastrongylus* spp. e as coccídias foram mais prevalentes em javalis do Baixo Alentejo. Apesar de não ter sido possível comparar javalis infetados por TB dos não infetados por TB, os animais da Lezíria do Tejo (sub-região não pertencente à área epidemiológica de risco para TB) apresentavam maior excreção de ovos do tipo estrongilídeo do que os do Baixo Alentejo (sub-região pretencente à área epidemiológica de risco para a TB), sugerindo uma fraca resposta imunitária contra helmintes. Contrariamente, os javalis do

Baixo Alentejo obtiveram uma maior percentagem de animais positivos a coccídeas, podendo revelar que apresentam uma fraca resposta imunitária a estes protozoários. Esta fraca resposta pode sugerir que estão mais vulneráveis a outros agentes protozoários, virais ou bacterianos, ou seja, mais suscetíveis à TB, sendo que estes animais provêm de uma zona epidemiológica de risco de TB. Com significado estatístico, verificou-se que o risco de um javali jovem se infectar com coccídias é 6,67 vezes maior ($IC_{95\%}=1,12-56-45\%$) do que em adultos. A intensidade de eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em jovens é 13,5 vezes maior ($IC_{95\%}=6,65-28,98\%$) do que em adultos e 22,63 vezes maior ($IC_{95\%}=4,79-404,59\%$) em fêmeas do que em machos. Os jovens são animais ainda com um sistema imunitário insuficiente por isso, acabam por se apresentarem mais parasitados.

As amostras congeladas de javalis abrangiam dois tipos de amostras: de animais não infectados por TB e de animais infectados por TB. Nos animais não infectados, observou-se estrongilídeos (25,0%), *Fasciola* sp. (6,3%) e *Ascaris* sp. (12,5%). Nas amostras de animais infectados por TB observou-se estrongilídeos (41,7%), *Metastrongylus* spp. (33,3%) e protozoários, nomeadamente, da família Eimeriidae (20,8%) e do género *Balantidium* (4,2%). A congelação nestas amostras mascarou os resultados obtidos, podendo ter-se observado outros parasitas, pertencentes à subordem *Strongylida*. Perante os resultados observados, é possível concluir que animais positivos a *M. bovis* encontravam-se mais parasitados por protozoários e *Metastrongylus* spp. Estes parasitas pulmonares podem assumir um papel importante, nas coinfeções com outros agentes patogénicos responsáveis por doenças do foro respiratório, como é o caso da tuberculose bovina, e que podem ser fatais para os suínos. As amostras fecais de veado foram todas colhidas no Baixo Alentejo. Nas amostras refrigeradas, os estrongilídeos foram os parasitas mais prevalentes. A presença de *Eimeria* spp., do género *Fasciola*, *Moniezia* e *Trichuris* foi reduzida. *Eimeria* spp. é menos prevalente nos adultos (a maioria das amostras), o céstode do género *Moniezia* é mais evidente na estação seca devido à atividade do seu hospedeiro intermediário. *Fasciola hepatica* é um parasita típico de zonas húmidas, por isso é natural observar poucos exemplares na região do Baixo Alentejo. A prevalência de *Cryptosporidium* spp. também foi baixa.

A técnica de Baermann possibilitou a visualização de larvas L1 de protostrongilídeos do género *Elaphostrongylus* (26,5%) e *Varestrongylus* (11,8%), podendo estes baixos níveis de prevalência revelar que os veados apresentavam uma boa condição física, ou que os parasitas estavam num período pré-patente, ou ainda pela libertação intermitente dos seus ovos.

Através da análise multivariada, chegou-se à conclusão que a intensidade de excreção de ovos do tipo estrongilídeo e de oocistos de *Cryptosporidium* spp. têm uma associação positiva em animais infectados com TB, podendo revelar que estes animais infectados têm o seu sistema imunitário debilitado e que não está a fazer o seu papel, eficazmente. Foi ainda observado, que os animais positivos a TB tinham prevalências mais elevadas de parasitas do que os

animais negativos a TB. Apesar destes resultados observados nas amostras de veados, temos de ter em conta que o número de amostras de animais infetados por TB era reduzida, podendo não corresponder completamente à realidade.

8 Perspectivas Futuras

A presença de populações de animais silvestres, em locais onde é possível o contato com as populações de animais domésticos e humanas, reforça a ideia de que os estudos sobre o estado sanitário de ungulados silvestres são cada vez mais importantes. Os animais silvestres contribuem para a manutenção de doenças infecciosas, além das doenças parasitárias, que podem ser sinérgicas entre si e ser transmissíveis a populações de animais domésticos e ao Homem. Seria interessante fazer um estudo sobre parasitas pulmonares em javalis e veados infetados com TB, visto que lesionam o sistema respiratório, local mais afetado pela micobactéria. Também se poderia fazer um estudo aprofundado sobre a excreção de oocistos de coccídias e *Cryptosporidium* spp. para perceber se contribui para a manutenção da doença. Além disso, é importante referir que, as amostras fecais têm de ser frescas e abranger um maior número de amostras de animais positivos a tuberculose bovina, para se conseguir tirar conclusões, que possam corresponder à realidade.

Nos ungulados silvestres que habitam em locais endémicos de tuberculose bovina, seria importante considerar o controlo de helmintes como ferramenta no controlo de TB, porque existem estudos, que demonstram que a redução das cargas parasitárias contribui para a eficiência do sistema imunitário, face a outros agentes patogénicos. E ainda, a gestão cinegética direcionada a uma menor densidade animal para diminuir o contacto de ungulados silvestres com outras espécies domésticas.

9 Bibliografia

- Agência Portuguesa do Ambiente, I.P. (2016). *SNIAmb - Sistema Nacional de Informação de Ambiente*. Acedido a 6 de Set., 2016, disponível em <http://sniamb.apambiente.pt>.
- Allwin, B., Jayathangaraj, M.G., Palanivelrajan, M. & Raman, M. (2015). Helminthic fauna of wild pigs in south India. *Journal of Wildlife Research*, 3(1), 1-4.
- Andreasen, A., Petersen, H.H., Kringel, H., Iburg, T.M., Skovgaard, K., Dawson, H., Urban Jr., J.F., Thamsborg, S.M. (2015). Immune and inflammatory responses in pigs infected with *Trichuris suis* and *Oesophagostomum dentatum*. *Veterinary Parasitology*, 207, 249-258.
- Bentwich, Z., Kalinkovich, A., Weisman, Z., Borkow, G., Beyers, N. & Beyers, A.D. (1999). Can eradication of helminthic infections change the face of AIDS and tuberculosis? *Immunology Today*, 20(11), 485-487.
- Bordes, F. & Morand, S. (2011). The impact of multiple infections on wild animal hosts: a review. *Infection Ecology and Epidemiology*, 1, 7346 - DOI: 10.3402/iee.v1i0.7346
- Bosch, J., Peris, S., Fonseca, C., Martinez, M., De La Torre, A., Iglesias, I. & Muñoz, J. (2012). Distribution, abundance and density of the wild boar on the Iberian Peninsula, based on the CORINE program and hunting statistics. *Folia Zoologica*, 61(2), 138-151.
- Bowman, D. D. (2014). *Georgis's Parasitology for Veterinarians*. (10^o Edição). St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier.
- Bruno de Sousa, C., Gajadhar, A., Catanho, H., Afonso-Roque, M., Madeira de Carvalho, L.M. (2014). *Elaphostrongylus cervi* Cameron, 1931 in red deer from Southern Portugal. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 20(1/2), 51-54.
- Bruno de Sousa, C., Madeira de Carvalho, L.M., Fazendeiro, I., Castro Rego, F. & Afonso-Roque, M.M. (2004). Contribution for the knowledge of wild boar (*Sus scrofa* L.) helminthic fauna in Tapada Nacional de Mafra, an enclosed hunting area. *Revista Ibérica de Parasitologia*, 64(1-4), 3-7.
- Bugalho, M.N., Milne, J.A. & Racey, P.A. (2001). The foraging ecology of red deer (*Cervus elaphus*) in a Mediterranean environment: Is a larger body size advantageous? *Journal of Zoology* (London), 255(3), 285-289.
- Calado, M.R.M. (2009). *Biologia e parasitoses do javali (Sus scrofa) e repovoamento de coelho-bravo (Oryctolagus cuniculus)*. Relatório Final de Estágio de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Porto: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto.
- Carranza, J. & Valencia, J. (1992). Organization social del ciervo en hábitat mediterráneo. *Miscellanea Zoologica*, 16, 223-232.
- Carranza, J. (1986). Configuración espacial de los grupos mixtos en el ciervo (*Cervus elaphus*) durante el período de celo. *Miscellanea Zoologica*, 10, 347-352.
- Carranza, J. (2011). Ciervo – *Cervus elaphus*. En: *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Carrascal, L. M., Salvador, A. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid, disponível em <http://www.vertebradosibericos.org/>

- Casemore, D.P., Armstrong, M. & Sands, R.L. (1985). Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *Journal of Clinical Pathology*, 38, 1337-1341.
- Castillo, L., Fernández-Llario, P., Mateos, C., Carranza, J., Benítez-Medina, J.M., García-Jiménez, W., Bermejo-Martín, F., Hermoso de Mendoza, J. (2011). Management practices and their association with *Mycobacterium tuberculosis* complex prevalence in red deer populations in Southwestern Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 98, 58-63.
- Castro-Hermida, J.A., García-Presedo, I., González-Warleta, M. (2011). Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in roe deer (*Capreolus capreolus*) and wild boars (*Sus scrofa*) in Galicia (NW, Spain). *Veterinary Parasitology*, 179, 216-219.
- CIMBAL (2016). CIMBAL - Comunidade Intermunicipal Do Baixo Alentejo. Acedido a Set. 12, 2016, disponível em <http://www.cimbal.pt/menu/598/caraterizacao.aspx>
- Companhia das Lezírias, S.A. (2015). *Relatório e Contas 2015*. Samora Correia, disponível em <http://www.cl.pt>
- Companhia das Lezírias, S.A. (2016). *Companhia das Lezírias*. Acedido em Set. 12, 2016, disponível em <http://www.cl.pt>
- Davidson, R.K., Kutz, S.J., Madslien, K., Hoberg, E. & Handeland, K. (2014). Gastrointestinal parasites in an isolated Norwegian population of wild red deer (*Cervus elaphus*). *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56:59.
- de Lisle, G.W., Bengis, R.G., Schmitt, S.M. & O'Brien, D.J. (2002). Tuberculosis in free-ranging wildlife: detection, diagnosis and management. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 21(2), 317-334.
- de Mera, I.G.F. (2007). *Factores implicados en la respuesta inmunitaria en el ciervo ibérico*. Tesis Doctoral em Biología y Tecnología de los Recursos Cinegéticos – Universidad de Castilla – La Mancha.
- Deem, S.L., Karesh, W.B. & Weisman, W. (2001). Putting theory into practice: Wildlife Health in Conservation. *Conservation Biology*, 15(5), 1224-1233.
- Díaz, P., Paineira, A., Dacal, V., Vázquez, L., Cienfuegos, S., Arias, M.S., Pato, F.J., Paz-Silva, A., Panadero, R., Sánchez-Andrade, R., López, C., Díez-Baños, P. & Morrondo P. *Eimeria* infections in wild (*Capreolus capreolus*) and extensive-reared domestic ruminants from Galicia (NW Spain). *Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol.*, 69(1), 93-89.
- Direção Geral de Alimentação e Veterinária (2011). *Caça Maior. Área epidemiológica de risco para a tuberculose de animais de Caça Maior. "Guia de Boas Práticas Higiênicas". Edital n.º 1-2011 da DGV*. Lisboa: DGV
- Druilhe, P., Spertini, F., Soesoe, D., Corradin, G., Mejia, P., Singh, S., Audran, R., Bouzidi, A., Oeuvray & Roussilhon, C. (2005). A malaria vaccine that elicits in humans antibodies able to kill *Plasmodium falciparum*. *PLoS Med*, 2(11) e344. doi:10.1371/journal.pmed.0020344
- Duarte, S.C., Sousa, S., Almeida, A., Madeira, B.A.M., Coelho, C. & Vieira Pinto, M.M. (2014). Endoparasitismo em javalis (*Sus scrofa*) da região de Trás-os-Montes e Alto Douro. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 20(1/2), 71-76.

- Ellis, P.D. (2010). *The essential guide to effect sizes: Statistical power, meta-analysis, and the interpretation of research results*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press.
- Ezenwa V.O., Etienne, R.S., Luikart, G., Beja-Pereira, A. & Jolles, A.E. (2010). Hidden consequences of living in a wormy world: Nematode-Induced immune suppression facilitates tuberculosis invasion in African buffalo. *The American Naturalist*, 176(5), 613-624.
- Ezenwa, V.O. & Jolles, A.E. (2011). From host immunity to pathogen Invasion: The effects of helminth coinfection on the dynamics of microparasites. *Integrative and Comparative Biology*. 51(4), 540-551.
- Fayer, R. & Nerad, T. (1996). Effects of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(4), 1431-1433.
- Fernández-Llario, P. & Mateos-Quesada, P. (1998). Body size and reproductive parameters in the wild boar *Sus scrofa*. *Acta Theriologica*, 43, 439-444.
- Fernández-Llario, P. (2005). The sexual function of wallowing in male wild boar (*Sus scrofa*). *Journal of Ethology*, 23, 9-14.
- Fonseca, C., da Silva, A.A., Alves, J., Vingada, J., Soares, A.M.V.M. (2010). Reproductive performance of wild boar females in Portugal. *European Journal of Wildlife Research*, 57(2), 363-371.
- Fonseca, C., Santos P., Monzón A., Bento P., Alves Da Silva, A., Alves, J., Silvério, A., Soares, A. & Petrucci-Fonseca, F. (2004). Reproduction in the wild boar (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758) populations of Portugal: *Galemys*, 16 (nº especial) pp. 53-65. ISSN: 1137-8700.
- García-González, Á., Pérez-Martín, J., Gamito-Santos, J.A., Calero-Bernal, R., Alonso, M.A. & Carrión, E.M.F. (2013). Epidemiologic study of lung parasites (*Metastrongylus* spp.) in wild boar (*Sus scrofa*) in southwestern Spain. *Journal of Wildlife Diseases*, 49(1), 157-162.
- García-Romero, C., Valcárcel, F., Corchero, J.M., Olmeda, A.S. & Pérez-Jiménez, J.M. (2000). Contribución al estudio de las parasitosis del ciervo (*Cervus elaphus*) en las provincias de Toledo y Ciudad Real (Castilla-La Mancha, España). *Ecología*, 40, 235-249.
- Gassó, D., Feliu, C., Ferrer, D., Mentaberre, G., Casas-Díaz, E., Velarde, R., Fernández-Aguilar, X., Colom-Cadena, A., Navarro-González, N., López-Olvera, J.R., Lavín, S., Fernández-Llario, P., Segalés, J., Serrano, E. (2015). Uses and limitations of faecal egg count for assessing worm burden in wild boars. *Veterinary Parasitology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.02.006>.
- Gassó, D., Rossi, L., Mentaberre, G., Casas E., Velarde, R., Nosal, P., Serrano, E., Segales, J., Fernández-Llario & Feliu C. (2014). Na identification key for the five most common species of *Metastrongylus*. *Parasitology Research*, 113(9), 3495-3500.
- Gibbons, L.M., Jacobs, D.E., Fox, M.T. & Hansen, J. (2014). The RVC/FAO Guide to Veterinary Diagnostic Parasitology. *Faecal examination of farm animals for helminth parasites*. Acedido a 10 de Fev., 2015, disponível em <http://www.rvc.ac.uk/review/Parasitology/Index/Index.htm>.
- Gomes, A.I.J.G. (2009). *Contribuição para a caracterização do parasitismo gastrintestinal e pulmonar em suínos de raça alentejana no distrito de Évora*. Dissertação de Mestrado

em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.

Gortazar, C., Vicente, J. & Gavier-Widen, D. (2003). Pathology of bovine tuberculosis in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Veterinary Record*, 152, 779-780.

Gortazar, C., Vicente, J., Samper, S., Garrido, J.M., Fernández-de-Mera, I.G., Gavin, P., Juste, R.A., Martín, C., Acevedo, P., De La Puente, M. & Höfle, U. (2005). Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from wild ungulates in south-central Spain. *Veterinary Research*, 36(1), 43-52.

Herrero, J. (2002). *Adaptación funcional del jabalí Sus scrofa L. a un ecosistema forestal y a un sistema agrario intensivo en Aragón*. Tesis Doctoral. Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares.

ICNF (2015). *Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas*. Acedido a 2 de agosto de 2015, disponível em <http://www.icnf.pt/portal/caca/sanidade/tcm>

Instituto Nacional de Estatística, I.P. (Ed.) (2016). *Estatísticas Agrícolas 2015*. Lisboa-Portugal: INE. ISSN 0079-4139.

Jenkins, E.J., Simon, A., Bachand, N. & Stephen, C. (2015). Wildlife parasites in a One Health world. *Trends in Parasitology*, 31, 174-180.

Jolles, A.E., Ezenwa, V., Etienne, R.S., Turner, W.C. & Olff, H. (2008). Interactions between macroparasites and microparasites drive infection patterns in free-ranging African buffalo. *Ecology*, 89(8), 2239-2250.

Kowal, J., Komaś, S., Nosal, P., Wajdzik, M., Basiaga, M. & Lesiak, M. (2014). Parasite infections in red deer *Cervus elaphus* from Krakow area, southern Poland. *Annals of Parasitology*, 61(1), 49-52.

Kusak, J., Špičić, S., Slijepčević, V., Bosnić, S., Ranka Rajković, J., Duvnjak, S., Sindičić, M., Majnarić, D., Cvetnić, Ž. & Huber, Đ. (2012). Health status of red deer and roe deer in Gorski kotar, Croatia. *Veterinarski Arhiv*, 82 (1), 59-73.

Lopes, F.V. & Borges, J.M.F. (2004). Wild boars in Portugal. *Galemys*, 16 (nº especial) pp. 243-251. ISSN: 1137-8700.

Lorentzen, G. and Halvorsen, O. (1986). Survival of the first stage larva of the meta-strongyloid nematode *Elaphostrongylus rangiferi* under various conditions of temperature and humidity. *Holarct. Ecol.* 9, 301-304

Madeira de Carvalho, L.M. (2001). *Epidemiologia e controlo da estrongilidose em diferentes sistemas de produção equina em Portugal*. Tese de Doutoramento. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, 445 pp.

Maia, M.J. (2001). Helminthofauna do veado (*Cervus elaphus* L.) e do gamo (*Dama dama* L.) na Tapada Nacional de Mafra. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 96(536), 81-84.

Maizels, R.M., Balic, A., Gomez-Escobar, N., Nair, M., Taylor, M.D. & Allen, J.E. (2004). Helminth parasites – masters of regulation. *Immunological Reviews*, 201(1), 89-116.

Martín-Hernando, M.P., Hofle, U., Vicente, J., Ruiz-Fons, F., Vidal, D., Barral, M., Garrido, J.M., de la Fuente, J. & Gortazar, C. (2007). Lesions associated with *Mycobacterium tuberculosis* complex infection in the European wild boar. *Tuberculosis*, 87(4), 360-367.

- Martín-Hernando, M.P., Torres, M.J., Aznar, J., Negro, J.J., Gandía, A. & Gortázar, C. (2010). Distribution of lesions in red and fallow deer naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Journal of Comparative Pathology*, 142(1), 43-50.
- Medne R., Krūklīte A., Keidāns P., Liepiņš E., KeidāneK., Eihvalde E., Ikauniece D. 2009. Parasitic infestation of animals in deer gardens in Latvia. *Acta Biol. Univ. Daugavp.*, 9 (1), 109 – 114.
- Mezo, M., González-Warleta, M., Castro-Hermida, J.A., Manga-González, M.Y., Peixoto, R., Mas-Coma, S. & Valero, M.A. (2013) The wild boar (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758) as secondary reservoir of *Fasciola hepatica* in Galicia (NW Spain). *Veterinary Parasitology*, 198, 274-283.
- Morandi, F., Galuppi, R., Nicoloso, S., Benazzi, C., Tampieri, M.P. & Simoni, P. (2006). Larvae of *Elaphostrongylus cervi* in a population of free-living red deer in Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, 42(4), 870-872.
- Morita, T., Haruta, K., Shibata-Haruta, A., Kanda, E., Imai, S. & Ike, K. (2007). Lung worms of wild boars in the western region of Tokyo, Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 69 (4), 417-420.
- Nansen, P. & Roepstorff, A. (1999). Parasitic helminths of the pig: factors influencing transmission and infections levels. *International Journal for Parasitology*, 29, 877-891.
- Naranjo, V., Gortazar, C., Vicente, J. & de la Fuente, J. (2008). Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Veterinary Microbiology*, 127, 1-9. doi:10.1016/j.vetmic.2007.10.002
- Navarro-Gonzalez, N., Fernández-Llario, P., Pérez-Martín, J.E., Mentaberre, G., López-Martín, J.M., Lavín, S. & Serrano, E. (2013). Supplemental feeding drives endoparasite infection in wild boar in Western Spain. *Veterinary Parasitology*, 196, 114-123.
- Nemejc, K., Sak, B., Kvetonova, D., Hanzal, V., Jenikova, M. & Kvac, M. (2012). The first report on *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II in Eurasian wild boars (*Sus scrofa*) (Czech Republic). *Veterinary Parasitology*, 184, 122-125.
- Neves, M.G.C. (2013). *Contribuição para a caracterização do parasitismo em suínos de raça ibérica e javalis silvestres das comunidades autónomas da Extremadura e Castilla y León (Espanha) e dos factores de risco associados*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Nielsen, M.K., Vidyashankar, A.N., Andersen, U.V., DeLise, K., Pilegaard, K. & Kaplan, M.R. (2010). Effects of fecal collection and storage factors on strongylid egg counts in horses. *Veterinary Parasitology*, 167, 55-61.
- Nosal, P., Kowal, J. & Nowosad, B. (2010) Structure of Metastrongylidae in wild boars from southern Poland. *Helminthologia*, 47(4), 212-218.
- Nugent, G. (2011). Maintenance, spillover and spillback transmission of bovine tuberculosis in multi-host wildlife complexes: A New Zealand case study. *Veterinary Microbiology*, 151, 34-42.
- Okoro, C.K., Wilson, B.S., Lorenzo-Morales, J. & Robinson, R.D. (2015) Gastrointestinal helminths of wild hogs and their potential livestock and public health significance in Jamaica. *Journal of Helminthology*, 1(2), 1-5.

- Oliver, W. & Leus, K. (2008). *Sus scrofa*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T41775A10559847. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T41775A10559847.en>.
- Panayotova-Pencheva, M.S. & Alexandrov, M.T. (2011). Etiopathological aspects of *Elaphostrongylus cervi* and *Varestrongylus sagittatus* infections in red deer in Bulgaria. *Acta Vet. Brno*, 80, 349-352.
- Popiołek, M., Knecht, D., Szczęsna-Staśkiewicz, J. & Czerwińska-Rożałow, A. (2010). Helminths of the wild boar (*Sus scrofa* L.) in natural and breeding conditions. *Bulletin-Veterinary Institute in Pulawy*, 54, 161-166.
- Presidente, P.J.A. (1993). *Elaphostrongylus* in deer: Detection of larvae in faeces. In Corner, L.A. & Bagust, T.J. (Eds). *Australian Standard diagnostic techniques for animal diseases*. East Melbourne, Victoria: CSIRO for the Standing Committee on Agriculture and Resource Management, pp.9.
- Rajković-Janje, R., Bosnić, S., Rimac, D., Dragicevic, P. & Vinkovic, B. (2002). Prevalence of helminths in wild boar from hunting grounds in eastern Croatia. *Z. Jagdwiss*, 48, 261-170.
- Ramajo Martín, V., Pérez Sánchez, R., Ramajo Hernández, A. & Oleaga, A. (2007). Preliminary data about the parasitism caused by Protozoa, Helminths and Ticks in cervids and wild bovids from Salamanca (western Spain). *Revista Ibérica de Parasitología*, 67(1-4), 69-77.
- Raposo, A.S.S. (2011). *Contributo para o estudo epidemiológico da tuberculose bovina em animais domésticos e silváticos na região de Portalegre*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Rasband, W.S. (2015). *ImageJ: Image Processing and Analysis in Java*. Acedido a 6 de abril de 2015. Disponível em <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2016.
- Reyes-García, R., Pérez de la Lastra, J.M., Vicente, J., Ruiz-Fons, F., Garrido, J.M., Gortazar, C. (2008). Large-scale ELISA testing of Spanish red reed for paratuberculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 124(1-2), 75-82.
- Rind, R. & Brohi, M.A. (2001). Factors affecting the survival and sporulation of *Eimeria* oocysts of cattle. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4(4), 487-491.
- Risco, D., Serrano, E., Fernández-Llario, P., Cuesta, J.M., Gonçalves, P., Garcáí-Jiménez, R., Cerrato, R., Velarde, R., Gomez, L., Segalés, J. & Hermoso de Mendoza, J. (2014). Severity of bovine tuberculosis is associated with co-infection with common pathogens in wild boar. *PLoS ONE*, 9(10), e110123. doi:10.1371/journal.pone.0110123
- Robertson, L.J., Campbell, A.T. & Smith, H.V. (1992). Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(11), 3494-3500.
- Robertson, L.J., Utaaker, K.S., Goyal K. & Sehgal, R. (2014). Keeping parasitology under the One Health umbrella. *Trends in Parasitology*. 30(8), 369–372.
- Roepstorff, A. & Nansen, P. (1998). *FAO Animal Health Manual nº3 - Epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of swine*. FAO: Rome.

- Roepstorff, A., Mejer, H., Nejsum, P. & Thamsborg, S.M. (2011). Helminth parasites in pigs: new challenges in pig production and current research highlights. *Veterinary Parasitology*, 180 (1-2), 72-81.
- Rosell, C. (1998). *Biologia i ecologia del senglar (Sus scrofa L., 1758) a dues poblacions del nord-est ibèric. Aplicació a la gestió*. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, Barcelona.
- Rosell, C., Fernández-Llario, P., Herrero, J. (2001). El Jabalí (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758). *Galemys*, 13(2), 1-25.
- Rosell, C., Navas, F., Romero, S. (2012). Reproduction of wild boar in a cropland and coastal wetland area: implications for Management. *Animal Biodiversity and Conservation*, 35(2), 209-217.
- Santín-Durán, M., Alunda J.M., Hoberg, E.P. & de la Fuente, C. (2004). Abomasal parasites in wild sympatric cervids, red deer, *Cervus elaphus* and fallow deer, *Dama dama*, from three localities across central and western Spain: relationship to host density and park management. *J. Parasitol.*, 90(6), 1378-1386.
- Santín-Durán, M., Alunda J.M., Hoberg, E.P. & de la Fuente, C. (2008). Age distribution and seasonal dynamics of abomasal helminths in wild red deer from central Spain. *J. Parasitol.*, 94(5), 1031-1037.
- Santos, D.J.F. (2013). *Caracterização do parasitismo de ungulados silvestres e aspectos da sua epidemiologia na Tapada Nacional de Mafra, Concelho de Mafra, Portugal*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.
- Santos, N., Almeida, V., Gortázar, C. & Correia-Neves, M. (2015). Patterns of *Mycobacterium tuberculosis*-complex excretion and characterization of super-shedders in naturally-infected wild boar and red deer. *Veterinary Research*, 46(1), 129.
- Santos, N., Correia-Neves, M., Ghebremichael, S., Kallenius, G., Svenson, S.B. & Almeida, V. (2009). Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in wild boar (*Sus scrofa*) from Portugal. *Journal of Wildlife Diseases*, 45(4), 1048-1061.
- Santos, N., Geraldes, M., Afonso, A., Almeida, V. & Correia-Neves, M. (2010). Diagnosis of tuberculosis in the wild boar (*Sus scrofa*): a comparison of methods applicable to hunter-harvested animals. *PLoS one*, 5(9), e12663. doi:10.1371/journal.pone.0012663
- Santos, P., Fernández-Llario, P., Fonseca, C., Monzón, A., Bento, P., Soares, A. M. V. M., Mateos-Quesada, P., Petrucci-Fonseca, F. (2005). Habitat and reproductive phenology of wild boar (*Sus scrofa*) in the western Iberian Peninsula. *European Journal of Wildlife Research*, 52(3), 207-212.
- Schurer, J., Davenport, L., Wagner, B. & Jenkins, E. (2014). Effects of sub-zero storage temperatures on endoparasites in canine and equine feces. *Veterinary Parasitology*, 204(3-4), 310-315.
- Senlik, B., Cirak, V.Y., Girisgin, O. & Akyol, C.V. (2011). Helminth infections of wild boars (*Sus scrofa*) in the Bursa province of Turkey. *Journal of Helminthology*, 85, 404-408.
- Shostak, A.W. & Samuel, W.M. (1984). Moisture and temperature effects on survival and infectivity of first-stage larvae of *Parelaphostrongylus odocoilei* and *P. tenuis* (Nematoda: Metastrongyloidea). *J. Parasitic.*, 70(2), 261-269

- Silva, A.S. & Müller, G. (2013). Parasitic helminths of the digestive system of wild boars bred in captivity. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 22(3), 433-436.
- Taylor, M.A., Coop, R.L. & Wall, R.L. (2007). *Veterinary Parasitology*. (3th ed.). Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.
- Thompson, R.C.A., Lymbery, A.J. & Smith, A. (2010). Parasites, emerging disease and wildlife conservation. *International Journal for Parasitology*, 40(10), 1163-1170.
- Trogu, T. (2015). *Giardia, Cryptosporidium and Eimeria infections in alpine wild ungulates: epidemiological investigation and management implications*. PhD course of veterinary hygiene and animal pathology. Dipartimento di Scienze veterinarie e Sanità pubblica da Facoltà di Medicina Veterinaria – Università Degli Studi di Milano.
- Ueno, H. & Gonçalves, P.C. (1998). Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. (4ª edição). Tokyo, Japan: Japan International Cooperation Agency.
- Valcárcel, F., Corchero, J., Olmeda, A.S., Rojo Vázquez, F.A. & García Romero, C. (2002). Gastrointestinal nematode infections of *Cervus elaphus* Castilla-La Mancha (Central Spain). *Revista Ibérica de Parasitología*, 62(3-4), 108-113.
- Van Wyk, J.A. & Mayhew, E. (2013). Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: A practical lab guide. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 80(1), Art. 539, 14 pages. <http://dx.doi.org/10.4102/ojvr.v80i1.539>
- Vicente, J., Fierro, Y. & Gortazar, C. (2005). Seasonal dynamics of the fecal excretion of *Elaphostrongylus cervi* (Nematoda, Metastrongyloidea) first-stage larvae in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) from southern Spain. *Parasitol. Res.*, 95, 60-64.
- Vicente, J., Höfle, U., Fernández-De-Mera, I.G. & Gortazar, C. (2007). The importance of parasite life history and host density in predicting the impact of infections in red deer. *Oecologia*, 152, 655-664.
- Vingada, J., Fonseca, C., Cancela, J., Ferreira J. & Eira, C. (2010). Ungulates and their management in Portugal. In: M. Apollonio, R. Andersen & R. Putman (Eds.) *European ungulates and their management in the 21st century*, (pp.392-418). Cambridge: Cambridge University Press.
- Yagoob, G., Saeed, M. & Ali, O. (2014). Helminth parasites of a hunted-wild boar (*Sus scrofa*) in the Talesh City, north of Iran. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, 3(3), 247-250.

10 Anexos

Anexo 1. Cultura bacteriológica para pesquisa de *Mycobacterium bovis/caprae* em amostras de gânglios linfáticos de javalis e veados

Material:

1. H₂O destilada (4 ml por amostra)
2. Solução descontaminante HPC 0,75 % (35 ml por amostra)
3. Microtubos de rosca com 500 µl de fenol (1 por amostra)
4. Tubos de plástico de fundo cônico de 50 ml, com tampa (1 por amostra)
5. Homogenizadores (1 por amostra)
6. Recipiente para homogenizadores usados
7. Pistons (1 por amostra)
8. Recipiente para pistons usados
9. Pipetas graduadas de 5 e 2 ml
10. Pontas de micropipetas de 1000 µl com filtro, com a ponta cortada
11. Placas de Petri (1 por 2 amostras)
12. Lâminas de bisturi (2 por amostra)
13. Tubos com meio de Coletsos (2 por amostra) – P3 microbiologia

Procedimento experimental:

1. Cortar 2-4 g de tecido (incluindo todos os diferentes tecidos colhidos e lesões eventualmente detectadas), em pedaços muito pequenos, com 2 lâminas de bisturi, numa placa de Petri.
2. Colocar 2-4 g de amostra no homogeneizador.
3. Juntar 4 ml de água destilada.
4. Homogeneizar com piston (dentro da câmara de luvas em pressão negativa).
5. Transferir 400 µl do homogeneizado para um microtubo de rosca com 500 µl de fenol para posterior extração de DNA.
6. Transferir o restante homogeneizado para um tubo de 50 ml de fundo cônico e adicionar 35 ml de HPC 0,75%.
7. Deixar em repouso à temperatura ambiente durante 2 h.
8. Centrifugar a 3500 rpm durante 30 min.
9. Verter a condensação presente nos tubos Coletsos e identificar com ID da amostra.

10. Descartar o sobrenadante, deixando cerca de 1 ml sobre o sedimento.
11. Retirar 200 µl do sobrenadante com uma micropipeta e inocular num tubo com meio de Coletsos.
12. Espalhar o inóculo na superfície do meio e colocar em posição horizontal numa estufa a 37 °C, com a tampa ligeiramente desenroscada até deixar de ter líquido visível.
13. Observar os tubos incubados 3 dias após inoculação para verificar a presença de bactérias de crescimento rápido, e se estiverem secos, enroscar a tampa e voltar a incubar a 37 °C, em posição vertical.
14. Observar os tubos uma vez por semana durante 15 semanas.
15. Descartar os tubos sem crescimento visível; os tubos com crescimento visível:
 - Se crescimento abundante, obter suspensão em microtubos de rosca com 500 µl de fenol + 1000 µl de água destilada estéril para identificação (identificar com ID da amostra seguido de “s”);
 - Se crescimento escasso, repicar para novo tubo com meio de Coletsos (identificar com ID da amostra seguido de “R”).

Anexo 2. Poster apresentado na VI Reunião de Ungulados Silvestres Ibéricos (RUSI)



PARASITISMO GI E PULMONAR DE UNGULADOS SILVESTRES CAÇADOS EM MONTARIAS DO CENTRO E SUL DE PORTUGAL CONTINENTAL

BERNARDINO, S.¹, GOMES, L.¹; SANTOS, N.²; MADEIRA DE CARVALHO, L.M.¹

¹CIISA, Fac. Med. Vet., ULisboa, Av. da Universidade Técnica de Lisboa, 1300-477 Lisboa, Portugal; ²Instituto de Investigação em Ciências da Vida e da Saúde, Escola de Ciências da Saúde, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal e ICVS/3B's, Laboratório Associado, Braga/ Guimarães



INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

O javali (*Sus scrofa*) e o veado (*Cervus elaphus*) são os ungulados silvestres mais utilizados na caça maior a nível nacional. Algumas montarias destas espécies estão infectadas por *Mycobacterium bovis*, que infeta muitas espécies de mamíferos selvagens e domésticos, assim como o homem ocorrendo co-infecção com outros agentes, nomeadamente de natureza parasitária. Este estudo teve como objetivo, nas duas espécies de ungulados, a caracterização parasitária gastrointestinal e pulmonar de animais infectados e não infectados por *Mycobacterium bovis*.



RESULTADOS

Nas análises coprológicas em javalis (n=78) e veados (n=38) verificou-se a presença de nematodos gastrointestinais em 83,3% e 76,3% dos animais, respetivamente.

Nos javalis, as amostras frescas e negativas a tuberculose (FTB-, n=43) encontravam-se 100% parasitadas. O nível médio de ovos por grama (OPG) foi 533,7 (mín. = 0 e máx = 4050) e o nível médio de oocistos por grama (OoPG) foi 689,5 (0-18400). Foram detetados ovos de *Metastrongylus* spp. (32,6%), *Trichuris suis* (14%), oocistos da família Eimeriidae (37,2%) e de *Cryptosporidium* spp. (69,8%). Das amostras congeladas e TB- (CTB-, n=16) 62,5% estavam parasitadas, observando ovos de *Fasciola hepatica* (6,3%) e *Ascaris suum* (12,5%). Das amostras congeladas e positivas a tuberculose (CTB+, n=19) 63,2% estavam parasitadas, detetando-se ovos de *Metastrongylus* spp. (26,3%) e oocistos da família Eimeriidae (31,6%) (Figs. 1-3 e Gráf. 1).

Dos 38 veados 76,3% estavam parasitados. As amostras FTB- (n=29) estavam 75,9% parasitadas. O nível médio de OPG foi 10,4 (0-150). Foram observados ovos de *Strongyloides* spp. (13,8%), oocistos de *Eimeria* spp. (6,9%) e larvas L1 de *Elaphostrongylus* sp. (20,7%) e *Varestrongylus* spp. (13,8%) (Figs. 4 a 5). Nas amostras CTB+ (n=5) e nas amostras FTB+ (n=4) foram observados ovos de estrongilídeos (40% e 75%, respetivamente), oocistos de *Eimeria* spp. (20% e 25%, respetivamente) e larvas L1 de *Elaphostrongylus* sp. (20% e 50%, respetivamente).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O estudo revelou que mais de 75% dos animais encontravam-se parasitados. Nos javalis, o género *Metastrongylus* spp. teve uma prevalência elevada (32,6%) nas amostras frescas e TB- comparativamente com estudo anterior (DUARTE *et al*, 2004). No género *Ascaris* (4,7%) e *Trichuris* (14%) (nas amostras frescas e TB-) a prevalência foi baixa. As coccídeas tiveram uma elevada prevalência nos javalis como é o caso de *Cryptosporidium* spp. (69,8%) nas amostras frescas e TB-. Relativamente aos cervídeos verificou-se uma intensidade de parasitismo mais baixo comparativamente aos javalis. No entanto, é de salientar que ainda assim, 75% dos animais estavam parasitados.

A forma de preservação das amostras influenciou os resultados pelo que não foi possível retirar conclusões quanto ao objetivo inicial do trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de fezes colhidas em montarias do centro e sul de Portugal Continental, nas épocas venatórias entre 2011 e 2015, foram conservadas a -20°C (n=40) ou a 5°C (n=76), e processadas através de técnicas coprológicas: contagem de ovos por grama (OPG) em câmara de McMaster, flutuação de Willis, sedimentação natural e técnica de Baermann para observação de larvas L1, esfregaços fecais para pesquisa de *Cryptosporidium* spp. e respetiva contagem de oocistos em 50 campos com a ampliação de 1000x como método semi-quantitativo (SANTOS *et al*, 2013).

Gráfico 1 - Percentagem de amostras de animais parasitados

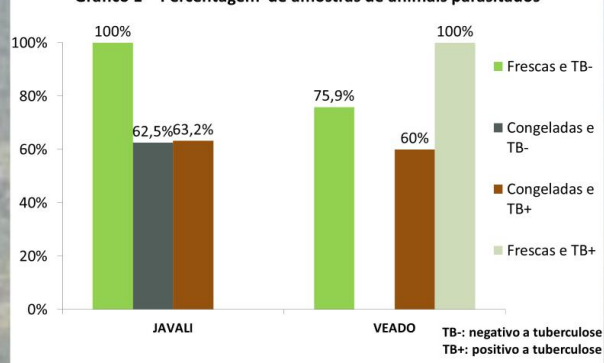


Fig. 4 - Larva L1 de *Varestrongylus* sp. em veado - 200x (original)



Fig. 5 - extremidade posterior da larva L1 de *Elaphostrongylus* sp. em veado (original)

BIBLIOGRAFIA

DUARTE SC, SOUSA S, ALMEIDA A, MADEIRA BAM, COELHO C, PINTO MMVR. (2014): Endoparasitismo em javalis (*Sus scrofa*) da Região de Trás-os-Montes e Alto Douro. *Acta Parasitológica Portuguesa*. 20(1/2): 71-76
SANTOS, D.J., GOMES, L.M., SOARES, J.F., MADEIRA DE CARVALHO L.M. (2013) Epidemiological features of parasite populations in wild ungulates from Tapada Nacional of Mafra, a wildlife reserve in Portugal, pp. 184-186. In *International Conference on Diseases of Zoo and Wild Animals*, Vienna, Austria, 8-11 May 2013, Book of Proceedings, 214 pp. (Extended Abstract)